

**Государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
“Уральская Государственная медицинская академия”
Министерства здравоохранения Российской Федерации
Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии**

Литусов Н.В.

ВОЗБУДИТЕЛЬ ХОЛЕРЫ

Иллюстрированное учебное пособие

Екатеринбург, 2013

УДК 612

Рецензент: доктор медицинских наук профессор заведующий кафедрой инфекционных болезней ГБОУ ВПО УГМА Борзунов В.М.

Литусов Н.В. Возбудитель холеры. Иллюстрированное учебное пособие. – Екатеринбург: Изд-во ГБОУ ВПО УГМА, 2013. - 52 с.

В иллюстрированном учебном пособии рассматриваются вопросы истории открытия и изучения холерного вибриона, его морфологические, культуральные, биохимические и антигенные свойства, факторы патогенности, эпидемиология и патогенез холеры, клиника заболевания, принципы диагностики, профилактики и лечения холеры. Учебное пособие включает вопросы для самоконтроля усвоения темы, тренировочные тесты, ситуационные задачи, приложения (состав питательных сред для культивирования холерного вибриона, методы изучения свойств возбудителя холеры), список учебной и методической литературы.

Учебное пособие предназначено для внеаудиторной подготовки студентов, обучающихся по специальностям 060101 (лечебное дело), 060103 (педиатрия), 060105 (медико-профилактическое дело), 060201 (стоматология) и 060301 (фармация) при освоении дисциплины Микробиология.

© Литусов Н.В.

© УГМА, 2013

Содержание

Историческая справка	4
Классификация возбудителя	11
Морфологические и тинкториальные свойства	12
Культуральные свойства.....	15
Биохимические свойства	17
Антигенная структура.....	19
Фагочувствительность	20
Резистентность холерного вибриона.....	20
Эпидемиология	20
Факторы патогенности холерного вибриона.....	22
Патогенез холеры	25
Клиническая картина холеры.....	27
Микробиологическая диагностика	29
Иммунитет.....	33
Лечение холеры	33
Профилактика холеры.....	34
Вопросы для самоконтроля усвоения материала.....	35
Тренировочные тесты	36
Ситуационные задачи	42
Приложение 1. Состав питательных сред, применяемых при культивировании холерного вибриона	43
Приложение 2. Методы изучения свойств холерного вибриона.....	45
Учебная и методическая литература	49

Историческая справка

Холера – опасное антропонозное инфекционное заболевание, протекающее по типу гастроэнтерита с интоксикацией и нарушением водно-электролитного обмена, приводящим к резкому обезвоживанию организма. Холера относится к карантинным инфекциям. Для холеры характерны фекально-оральный механизм заражения, поражение тонкого кишечника, выраженная склонность к широкому эпидемическому распространению, тяжелое течение с водянистой диареей и рвотой, развитие различной степени обезвоживания организма, высокая летальность.

Холера известна с незапамятных времен. Она описана в трудах Гиппократ (греч. *cholera* – истечение жидкостей тела, от *chole* – желчь, *rheo* – течь, истекать). По имеющимся данным, первое научное описание эпидемии холеры было сделано в 1563 г. португальским врачом Garcia del Huerto в Индии.

Исторической родиной холеры считается Индия, где эпидемии этой болезни отмечались еще за 500 лет до нашей эры. Длительному сохранению и размножению возбудителя холеры способствуют климатические условия Индии (благоприятная для возбудителя среднегодовая температура воздуха 25-29⁰С, обилие осадков, заболоченность местности, большое количество органических веществ в воде в результате непрерывного загрязнения рек сточными водами и испражнениями), высокая плотность населения, низкий материальный уровень жизни и своеобразные религиозно-культовые обряды (рисунок 1).



Рисунок 1 – Омовение в водах Ганга.

В истории распространения и изучения холеры выделяют 4 периода.

Первый период охватывает промежуток времени от древнейших времен до 1817 г. В это время холера в виде эпидемий регистрировалась лишь в Юго-Восточной Азии (в основном в Индии) и не выходила за ее пределы.

Второй период охватывает 1817-1926 гг. В это время холера распространилась по всем континентам в виде 6 пандемий, унесших миллионы человеческих жизней. Поэтому холера изображалась в образе смерти, выкашивающей больных людей (рисунок 2).



Рисунок 2 – Обложка журнала начала XX века, изображающая образ смерти, выкашивающей больных холерой.

В 1823 г. холера проникла в Россию, а в 1830-1831 гг. – в Европу. Проникновение холеры в Европу происходило через Ближний Восток, Египет и порты Средиземноморья. В течение второго периода были изучены этиология и основные эпидемиологические особенности этого заболевания.

В частности, английский врач Д. Сноу при изучении вспышки холеры в Лондоне в 1854 г. предположил и обосновал водный путь передачи возбудителя болезни при употреблении загрязненной воды из р. Темзы и колонок (рисунки 3 и 4).



а



б

Рисунок 3 – а - Джон Сноу (John Snow, 1813 – 1858 гг.); б - “колонка смерти” – иллюстрация к гипотезе Д. Сноу о водном пути передачи возбудителя холеры.



Рисунок 4 – Холера в образе смерти плывет по грязной Темзе среди нечистот и дохлых крыс.

В 1854-1855 гг. итальянский анатом Ф. Пачини (рисунок 5) описал изменения слизистой оболочки тонкого кишечника при холере. Он обнаружил в слизистой оболочке и в испражнениях больных людей большое количество изогнутых палочковидных телец, изобразил их на своих рисунках и назвал их истинными возбудителями холеры - *Filippo Pacini bacillum*. Смерть при холере он считал результатом сильнейшего обезвоживания организма.



Рисунок 5 – Филиппо Пачини (Filippo Pacini, 1812 – 1883 гг.).

Для выяснения причин холеры в 1883 г. в Египет были направлены французская экспедиция под руководством Э. Ру и немецкая экспедиция под руководством Р. Коха (рисунки 6-8).



а

б

в

Рисунок 6 – Члены французской экспедиции, изучавшей этиологию холеры в Египте в 1883-1884 гг.: а - Эмиль Ру (Pierre Paul Emile Roux, 1853-1933 гг.), б - Эдмонд Нокар (E.-I.-E. Nocard, 1850-1903 гг.), в - Луи Тюйе (Louis Thuillier, 1856-1883 гг.).



а



б

Рисунок 7 – Немецкие ученые, изучавшие этиологию холеры в 1883-1884 гг.: а - Роберт Кох (Heinrich Hermann Robert Koch, 1843-1910 гг.), б - Георг Гаффки (Georg Theodor August Gaffky, 1850-1918 гг.).



Рисунок 8 – Р. Кох с членами экспедиции в Египте, 1884 г.

Во время исследований Л. Тьюе заразился и погиб. Р. Кох возложил на его могилу венок с надписью “Этот скромный венок из лавров, но им венчают героев”.

В последующем немецкие ученые для продолжения своей работы перебазировались в Индии, где в 1883 г. Р. Кох из испражнений больных и трупов погибших людей выделил чистую культуру возбудителя (*Vibrio cholerae asiaticae*, *Vibrio comma*, “запятая Коха”, лат. *comma* - запятая) и подробно описал его свойства. Выделению возбудителя способствовало то, что незадолго до этого Р. Кох разработал метод культивирования бактерий на поверхности пластинок желатина на стекле (прообраз плотных питательных сред).

Изучение выделенного возбудителя показало, что холерный вибрион не обладает гемолитической активностью, поэтому встречающиеся гемолитические вибрионы относили к группе непатогенных бактерий. Однако в 1906 г. на карантинной станции Эль-Тор (рисунок 9) на западном побережье Синайского полуострова из кишечника паломника, погибшего от холероподобного заболевания, супругами Ф. и Е. Готшлих (F. и E. Gotschlich) был выделен вибрион (вибрион *El-Tor*), сходный по своим свойствам с классическим холерным вибрионом и агглютинирующийся холерной О-сывороткой. Однако в отличие от классического холерного вибриона выделенный вибрион *El-Tor* обладал гемолитической активностью и резистентностью к полимиксину В.

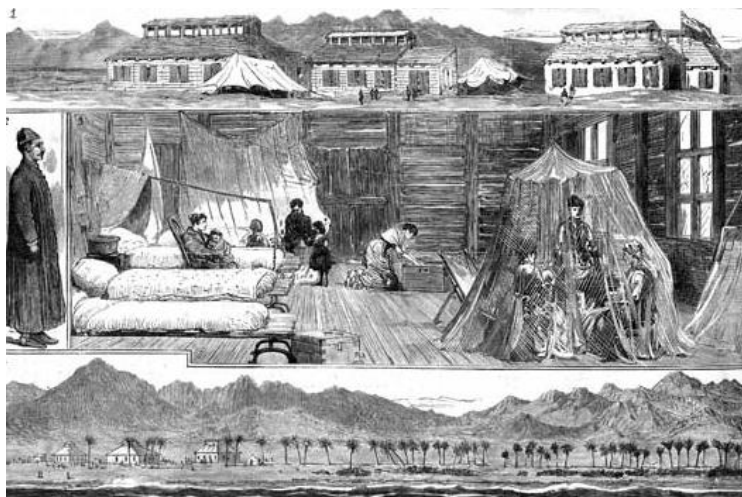


Рисунок 9 – Карантинная станция Эль-Тор (El-Tor).

В то время эпидемии холеры не было, поэтому роль вибриона Эль-Тор в заболевании людей длительное время оставалась неясной.

Третий период распространения и изучения холеры продолжался в течение 1926-1961 гг. В это время холера регистрировалась в основном в районах Юго-Восточной Азии (Пакистан, Индия, Бангладеш). Однако в 1937 г. на о. Сулавеси (Индонезия) была зарегистрирована крупная и тяжелая вспышка заболевания с симптомами холеры, вызванная вибрионом Эль-Тор. Летальность во время вспышки была свыше 60%. В последующем это заболевание распространилось на другие страны, а в 1961 г. вибрион Эль-Тор, распространившись по многим континентам, стал виновником седьмой пандемии холеры. В связи с этим в 1962 г. вибрион Эль-Тор был отнесен к холерным вибрионам и получил название *Vibrio cholerae biovar El-Tor*.

Четвертый период начался в 1961 г. Этот период характеризуется тем, что заболевания были обусловлены не только вибрионами Эль-Тор, но и штаммами нового серовара O139. Серовар холерного вибриона O139 (вариант *bengal*) был обнаружен в 1990 г. в индийском штате Западная Бенгалия во время вспышки диарейного холероподобного заболевания. В 1992-1993 гг. этот вариант возбудителя вызвал крупную эпидемию холеры в Бангладеш, Индии, Китае, Малайзии и других странах. Вариант O139 отличается от *V. cholerae* группы O1 тем, что он имеет антиген O139 и не агглютинируется другими O-сыворотками. По остальным свойствам этот вариант не отличается от классического холерного вибриона.

В историческом плане выделяют 7 пандемий холеры (таблица 1).

Таблица 1 – Пандемии холеры

Номер пандемии	Годы распространения	Особенности пандемии
1	1817-1829	Выход холеры за границы исторического очага и распространение на Аравийский полуостров, Цейлон, в Китай, Иран, Турцию, на Кавказ, в Россию (города Каспийского бассейна – Астрахань, Баку)
2	1830-1837	Началась в Индии, затем распространилась в Китай, Афганистан, Россию, Европу, Северную Америку, Северную Африку, Австралию
3	1844-1864	Началась в Индии, Китае, Афганистане, распространилась в Россию, Европу, Северную Америку
4	1865-1875	Началась в Индии, распространилась в Китай, Японию, Россию, Европу, Африку, Америку
5	1883-1896	Распространение в Азии, России, Европе, Америке, Африке
6	1900-1926	Вялое течение заболевания. Холера практически не распространилась на западное полушарие
7	С 1961	С островов Индонезии распространилась практически по сему миру. Преобладают субклинические формы инфекции

В России седьмая пандемия холеры началась в 1970 г. Заболевания были отмечены в Астраханской области, Заволжье, Одессе.

Значительный вклад в изучение холеры внесли такие ученые как В.А. Хавкин, З.В. Ермольева, Н.Ф. Гамалея, Д.К. Заболотный.

В 1892 г. В.А. Хавкин (рисунок 10) создал первую живую вакцину против холеры, испытал ее на себе и в 1893 г. наладил производство этой вакцины в Индии. За 2 года он иммунизировал более 42000 человек, в результате чего заболеваемость холерой и смертность от нее в Индии существенно снизились.



Рисунок 10 - Хавкин Владимир Аронович (1860-1930 гг.).

З.В. Ермольева (рисунок 11) занималась изучением устойчивости возбудителя холеры к дезсредствам, вопросами профилактики холеры, исследованием роли холероподобных вибрионов в патологии человека. Для установления патогенности вибрионов она проводила опыты по самозаражению.



Рисунок 11 – Зинаида Виссарионовна Ермольева (1898-1974 гг.).

Н.Ф. Гамалей (рисунок 12) известен работами по эпидемиологии и профилактике холеры, патогенности выделенных им холероподобных вибрионов.



Рисунок 12 – Николай Федорович Гамалей (1859-1949 гг.).

Д.К. Заболотный (рисунок 13) внес значительный вклад в изучение эпидемиологии холеры.



Рисунок 13 - Даниил Кириллович Заболотный (1866-1929 гг.)

С 1961 по 1996 г. холерой в 146 странах переболело 3943239 человек. Стойкие эндемичные очаги холеры сформировались в Юго-Восточной Азии и африканских странах. Так, в 2003 г. крупные вспышки холеры были отмечены в Либерии (33604 больных), Конго (22768 больных), Мозамбике (13758 больных), Сомали (4877 больных). В 2010 г. крупная вспышка холеры отмечена на Гаити. По данным ВОЗ, в последние годы в мире ежегодно регистрируется от 3 до 5 млн. случаев заболевания холерой, в том числе 100-130 тысяч летальных случаев. Высокая заболеваемость и смертность отмечаются в основном в развивающихся странах. Возникновение холеры в России связано с реальной возможностью ее завоза из других стран, неблагополучных по этой инфекции. Так, в период 2005-2010 гг. в России было зарегистрировано 8 случаев завоза холеры из Индии и Таджикистана.

Классификация возбудителя

Вид *V. cholerae* относится к роду *Vibrio* семейству *Vibrionaceae* отряду *Cracilicutes*. Род *Vibrio* насчитывает 55 видов, из которых наибольшее значение для человека имеют *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* и *V. fluvialis*. Эти виды вибрионов вызывают у человека различные по клиническим признакам заболевания (холеру, гастроэнтериты, отиты, раневую инфекцию, менингит). В таблице 2 представлены виды рода *Vibrio*, имеющие медицинское значение.

Таблица 2 - Виды рода *Vibrio*, имеющие медицинское значение

Вид	Источник инфекции	Клинические проявления
<i>V. cholerae</i>	Больной человек и бактерионоситель	Холера

<i>V. parahaemolyticus</i>	Морская вода, морские продукты	Гастроэнтерит, раневая инфекция, бактериемия
<i>V. vulnificus</i>	Морская вода, морские продукты	Бактериемия, целлюлиты, кардиоваскулиты, уретриты
<i>V. alginolyticus</i>	Морская вода	Раневая инфекция, отиты
<i>V. hollisae</i>	Морская вода, морские продукты	Гастроэнтерит, раневые инфекции, бактериемия
<i>V. fluvialis</i>	Морская вода	Гастроэнтерит, раневые инфекции, бактериемия
<i>V. damsela</i>	Морская вода	Раневые инфекции
<i>V. furnissii</i>	Неизвестен	Гастроэнтерит
<i>V. metschnikovii</i>	Пресная и солоноватая вода, морские продукты	Бактериемия, раневые инфекции
<i>V. circinnatiensis</i>	Неизвестен	Бактериемия, менингит, энцефалит
<i>V. mimicus</i>	Морская вода, морские продукты	Гастроэнтерит, диарея

Вид *V. cholerae* включает 206 серогрупп, которые различаются по структуре соматического О-антигена. Их разделяют на агглютинирующиеся типовой холерной О1-сывороткой (*V. cholerae* О1) и на неагглютинирующиеся типовой холерной О1-сывороткой (*V. cholerae* non О1). Вибрионы, неагглютинирующиеся О1-сывороткой, называются неагглютинирующимися (НАГ) вибрионами.

“Классическая” холера вызывается холерным вибрионом серогруппы О1 (*V. cholerae* О1). К этой серогруппе относятся 2 биовара: классический (*V. cholerae* биовар *cholerae* или *V. cholerae* биовар *asiaticae*) и Эль-Тор (*V. cholerae* биовар *eltor*). Биовары *V. cholerae cholerae* и *V. cholerae eltor* включают по 3 биотипа: Инаба (Inaba), Огава (Ogawa) и Гикосима (Hikojima). Кроме представителей серогруппы О1 холеру вызывает вибрион серогруппы О139 (*V. cholerae bengal*).

Вибрионы, относящиеся к другим серологическим группам (О2-О138, О140-О206), могут вызывать у людей спорадические или групповые случаи диарейных заболеваний, не склонных к эпидемическому распространению.

Морфологические и тинкториальные свойства

V. cholerae представляет собой изогнутые короткие подвижные палочки. Размеры клеток холерного вибриона составляют 1,5-4,0х0,2-0,6 мкм. Для холерных вибрионов характерен полиморфизм – в клиническом материале обнаруживаются типичные изогнутые формы, а в препаратах с питательных сред преобладают прямые палочковидные формы (рисунок 14).

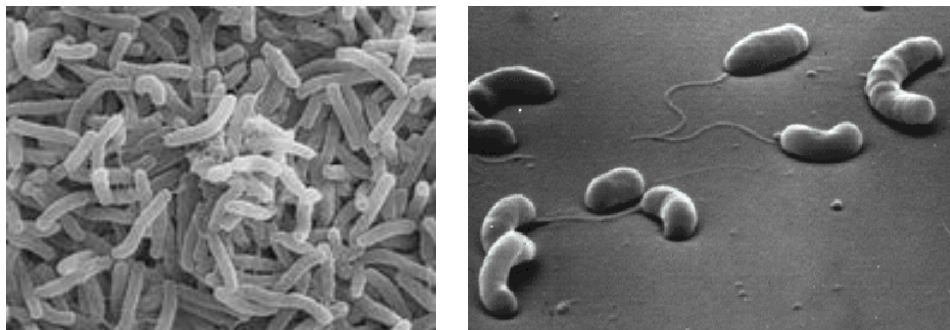


Рисунок 14 – Холерный вибрион под электронным микроскопом.

Холерный вибрион является монотрихом, так как имеет один длинный жгутик, расположенный на конце клетки. Жгутик в 2-3 раза длиннее тела клетки (рисунок 15).



Рисунок 15 – Жгутик у холерного вибриона, электронная микрофотография.

Жгутик снабжён чехликом и продольным выростом, напоминающим ундулирующую мембрану. Жгутики хорошо выявляются при окраске препаратов по методу Лейфсона (рисунок 16).

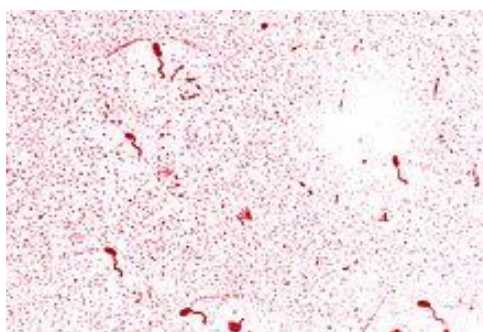


Рисунок 16 – Жгутики *V. cholerae*. Окраска по методу Лейфсона.

Подвижность холерных вибрионов является одним из диагностических признаков возбудителя.

Пили (фимбрии) представляют собой тонкие гибкие нитевидные образования на поверхности бактериальной клетки (рисунок 17).



Рисунок 17 – Пили на поверхности клеток холерного вибриона, компьютерное изображение.

Пили являются рецепторами для фага СТХф. Они необходимы для колонизации микроворсинок тонкого кишечника и принимают участие в образовании биопленки на поверхности тела гидробионтов.

Клетки холерного вибриона хорошо окрашиваются основными анилиновыми красителями, грамотрицательные (рисунок 18).

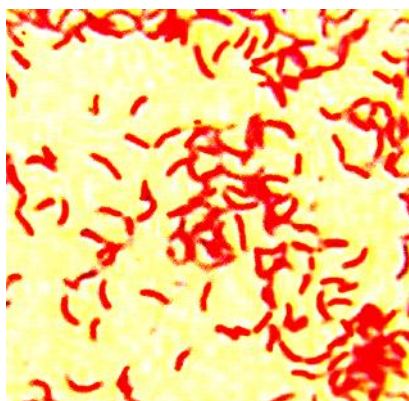


Рисунок 18 – Холерный вибрион, окраска по Граму.

Широко используется окраска препаратов разведенным карболовым фуксином Циля. При этом вибрионы приобретают интенсивный розовый цвет (рисунок 19).

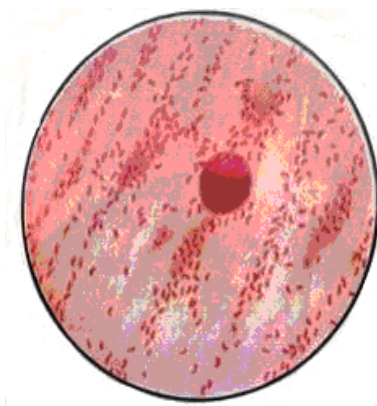


Рисунок 19 – Холерный вибрион, окраска карболовым фуксином Циля.

Холерный вибрион не образует спор. Клетки *V. cholerae* серогруппы O1 не образуют капсулы, а клетки *V. cholerae* серогруппы O139 имеют полисахаридную капсулу.

Культуральные свойства

Холерные вибрионы являются факультативными анаэробами, но предпочитают аэробные условия выращивания. Оптимальная температура культивирования составляет 37°C. Холерные вибрионы относятся к группе щелочелюбивых микроорганизмов. Они хорошо растут на простых питательных средах с высоким значением pH (7,6-8,2). Это свойство используется при подборе питательных сред для выращивания холерного микроба. Элективными питательными средами для культивирования холерного вибриона являются щелочной МПА, TCBS-агар (питательный агар с тиосульфатом натрия, цитратом, бромтимоловым синим и сахарозой), среда СЭДХ (сухая элективно-дифференциальная среда для выделения холерного вибриона) или СЭДХ-М (модернизированная среда СЭДХ), среда Монсура (таурохолат-теллуриновый агар с желатином). Состав питательных сред, применяемых для выращивания холерного вибриона, представлен в приложении №1.

Чаще всего используют щелочной МПА, на котором холерный вибрион образует круглые гладкие стекловидно-прозрачные с голубоватым оттенком и слабой опалесценцией колонии S-формы вязкой консистенции (рисунок 20). Размер колоний на щелочном агаре через 10-12 часов культивирования не превышает 1 мм в диаметре, а через 18-24 часа достигает 2-3 мм.



Рисунок 20 – Рост холерного вибриона на щелочном МПА.

На TCBS-агаре возбудитель холеры образует плоские полупрозрачные желтые колонии размером 2-3 мм в диаметре на сине-зеленом фоне среды (рисунок 21).

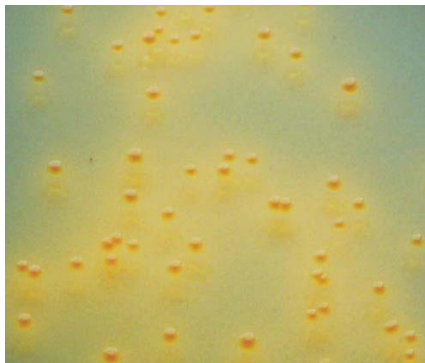


Рисунок 21 – Рост холерного вибриона на TCBS-агаре.

На среде Монсура (желтого цвета) через 12-18 часов культивирования формируются колонии серого или черного цвета (за счет восстановления теллурита) диаметром 2,0-2,5 см (рисунок 22).

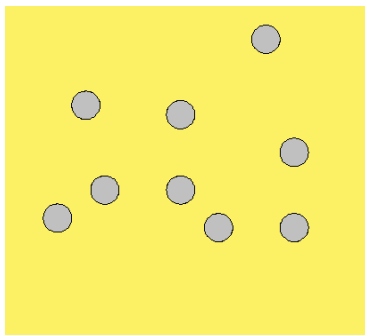


Рисунок 22 – Компьютерное изображение роста холерного вибриона на среде Монсура.

В щелочной пептонной воде (рН 8,6-9,0), содержащей 0,5-1,0% натрия хлорида, холерный вибрион уже через 6-8 часов вызывает легкое помутнение и образование нежной голубоватой плёнки на поверхности среды, края пленки приподняты вдоль стенок пробирки (рисунок 23), при встряхивании пленка легко разрушается и оседает на дно пробирки.



Рисунок 23 - Характер роста холерного вибриона в щелочной пептонной воде: а – контроль, б – опыт.

Пептонная вода с добавлением 0,5-1% натрия хлорида является оптимальной средой накопления при выделении возбудителя холеры из исследуемого материала.

Биохимические свойства

Возбудители холеры обладают сахаролитической и протеолитической активностью. Холерные вибрионы сбраживают с образованием кислоты без газа глюкозу, сахарозу, маннозу, маннит, лактозу (медленно), крахмал. Ферментация глюкозы может протекать как в аэробных, так и в анаэробных условиях. Эта способность выявляется на среде Хью-Лейфсона. Среда содержит питательный агар, глюкозу и индикатор. Посев производится вглубь столбика агара в две пробирки. В одну из пробирок вносят вазелиновое масло для создания анаэробных условий. При росте холерного вибриона цвет среды за счет разложения глюкозы до кислоты изменяется в обеих пробирках.

Холерный вибрион не ферментирует арабинозу, лактозу и инозит. По способности ферментировать маннозу, сахарозу и арабинозу Б. Хейберг распределил все вибрионы (холерные и холероподобные) на несколько групп (таблица 3).

Таблица 3 – Классификация вибрионов по Б. Хейбергу

Группа	Ферментация		
	маннозы	сахарозы	арабинозы
I	+	+	-
II	-	+	-
III	+	+	+
IV	-	+	+
V	+	-	-
VI	-	-	-
VII	+	-	+
VIII	-	-	+

Холерные вибрионы относятся к первой группе Б. Хейберга (ферментируют маннозу и сахарозу и не разлагают арабинозу).

Протеолитическая активность холерного вибриона выявляется при посеве культуры уколом в столбик желатина. Холерные вибрионы обладают плазмокоагулирующим (свёртывают плазму крови) и фибринолитическим (разжижают свёрнутую сыворотку) действием. Они свёртывают молоко, разлагают белки до аммиака и индола, сероводорода не образуют, восстанавливают нитраты в нитриты (положительная нитрозо-индоловая реакция).

Биовар Эль-Тор обладает гемолитической активностью в отношении эритроцитов барана. Лизис эритроцитов барана определяется в пробе Грейга. Гемолизин действует как порообразующий токсин. Однако в настоящее время

выделяются штаммы *V. cholerae eltor*, утратившие гемолитические свойства. Такие штаммы отличаются от классических холерных вибрионов только способностью агглютинировать эритроциты и устойчивостью к полимиксину В. Вибрионы серогруппы O139 также не обладают гемолитической активностью и устойчивы к полимиксину В, но в отличие от *V. cholerae eltor* имеют капсулу.

Методы изучения свойств холерного вибриона представлены в приложении №2. Биохимические признаки позволяют дифференцировать возбудителей холеры (таблица 4).

Таблица 4 - Дифференциальные признаки возбудителей холеры

Признак	<i>V. cholerae</i> биовар классический	<i>V. cholerae</i> биовар <i>eltor</i>	<i>V. cholerae</i> серовар O139 (Бенгал)
Реакция Фогеса-Проскауэра (образование ацетилметилкарбинола)	± (чаще -)	± (чаще +)	± (чаще +)
Рост на среде с полимиксином В (50 ед./мл)	-	+	+
Гемолиз эритроцитов барана	-	+	-
Агглютинация куриных эритроцитов	-	± (чаще +)	± (чаще +)
Образование капсулы	-	-	+
Чувствительность к классическому бактериофагу	+	-	-
Чувствительность к бактериофагу Эль-Тор	-	+	-

Реакция Фогеса-Проскауэра основана на том, что при культивировании бактерий семейства *Vibrionaceae* на среде Кларка накапливается ацетоин (продукт анаэробного превращения глюкозы), который обнаруживается по розовой окраске среды после добавления раствора едкого калия.

Способность к росту на среде с полимиксином (50 ед./мл) определяют путем посева культуры на агар с антибиотиком в чашке Петри с последующим инкубированием посевов при температуре 37°C в течение 18 часов. Холерные вибрионы классического биовара (*V. cholerae* биовар *cholerae*) не растут на полимиксиновом агаре, а для других холерных вибрионов этот признак является положительным (отмечается рост культуры) или переменным.

Гемолиз эритроцитов барана (проба Грейга) выявляют путем добавления к бульонной культуре вибрионов взвеси эритроцитов с последующим инкубированием в течение 2 часов в термостате при температуре 37°C, а затем – в холодильнике в течение суток. Положительный результат проявляется частичным или полным лизисом эритроцитов (лаковая кровь). В контроле (взвесь эритроцитов в бульоне) гемолиз отсутствует, отмечается осадок эритроцитов на дне пробирки, надосадочная жидкость прозрачная.

Агглютинацию куриных эритроцитов определяют на предметном стекле

(слайд-агглютинация), смешивая суспензию агаровой культуры с куриными эритроцитами. При положительной реакции отмечается склеивание эритроцитов. В контролях (взвесь эритроцитов в растворе хлорида натрия и суспензия исследуемой культуры в растворе хлорида натрия) агглютинация отсутствует.

Чувствительность к бактериофагам выявляют следующим образом. На поверхность щелочного агара в чашке Петри наносят смесь 0,5-0,7%-ного агара и бульонной культуры возбудителя. После застывания агара с помощью петли или пастеровской пипетки на поверхность наносят капли диагностических бактериофагов. Инкубируют в термостате при температуре 37°C в течение 18-20 часов. Положительный результат проявляется в виде одного стерильного пятна или группы мелких негативных колоний в месте нанесения капли бактериофага.

Восстановление нитратов и образование индола учитывает **нитрозо-индоловая реакция (холера-рот-реакция)**. Для постановки этого теста в пептонную воду добавляют 0,1% калия или натрия нитрата и высевают исследуемую культуру. К выросшей культуре добавляют 1-2 капли концентрированной серной кислоты. Положительная реакция проявляется в изменении первоначального желтого цвета среды на ярко-красный, что свидетельствует об образовании нитрозоиндола. Механизм реакции заключается в том, что холерный вибрион восстанавливает нитрат в нитрит, а добавленная серная кислота вытесняет из нитрита азотистую кислоту, которая соединяется с индолом с образованием нитрозоиндола, придающего среде красный цвет.

Протеолитические свойства определяются путем посева культуры уколом в столбик желатина. Положительный результат проявляется разжижением желатина после культивирования при температуре 37°C.

Антигенная структура

У вибрионов выделяют термостабильные О-антигены и термолабильные Н-антигены. По структуре О-антигена выделяют 206 серологических групп вибрионов (O1 – O206). Возбудителями холеры являются вибрионы, относящиеся к серогруппам O1 и O139. В составе O1-антигена холерных вибрионов выделяют компоненты А, В и С. По сочетанию этих компонентов различают три серотипа *V. cholerae* - серотип Огава (компоненты А и В), серотип Инаба (компоненты А и С) и серотип Гикосима (компоненты А, В и С). Возбудители классической холеры и холеры Эль-Тор объединяют в O1-серогруппу. Серогруппу O139 представляют *V. cholerae bengal*.

Н-антиген представляет собой термолабильный белок флагеллин. Этот антиген является общим для всего рода *Vibrio*.

В стадии диссоциации холерный вибрион имеет OR-антиген. Сыворотка против OR-антигена используется наряду с О-сывороткой и типоспецифическими сыворотками Инаба и Огава для идентификации *V. cholerae*.

Фагочувствительность

Холерный бактериофаг впервые описал в 1918 г. Ф. д'Эрелль. В настоящее время известно несколько холерных бактериофагов. С. Мукерджи разделил холерные бактериофаги на 4 группы. Для фаготипирования *V. cholerae* он предложил набор бактериофагов. В последующем этот набор был дополнен другими фагами. Используемый в настоящее время набор из семи бактериофагов позволяет выделять среди *V. cholerae* 16 фаготипов.

Однако для дифференциации холерных вибрионов используют монофаги. Холерный диагностический фаг С избирательно лизирует холерные вибрионы классического типа, фаг Эль-Тор 2 - вибрионы Эль-Тор. Существуют фаги, лизирующие вибрионы обоих типов. Холерные бактериофаги используются в диагностических целях и практически не имеют терапевтического значения.

Резистентность холерного вибриона

Холерный вибрион во внешней среде чувствителен к высушиванию и действию прямых солнечных лучей, но хорошо сохраняется и размножается при температуре выше 10-12°C в открытых водоемах и сточных водах, богатых органическими веществами. В частности, в водоемах возбудитель сохраняется в течение 2-3 недель.

Холерные вибрионы хорошо сохраняются при низкой температуре: во льду - до 1 месяца; в морской воде - до 47 суток, в речной воде - от 3-5 дней до нескольких недель, в почве - от 8 дней до 3 месяцев. В свежих испражнениях больного возбудитель холеры сохраняется до 3 суток, на белье, загрязненном испражнениями больных, сохраняется до 2 суток, а на влажном материале - неделю.

На вареных продуктах (рис, лапша, мясо, каши и др.) холерные вибрионы выживают в течение 2-5 дней, на сырых овощах - 2-4 дней, на фруктах - 1-2 дней, в молоке и молочных продуктах - 5 дней. При хранении продуктов в холодильнике срок выживания возбудителя увеличивается на 1-3 дня. Холерные вибрионы при 50°C погибают через 30 минут, при 80°C - через 5 минут, при 100°C - через несколько секунд.

Холерные вибрионы очень чувствительны к действию дезинфектантов, особенно с кислым значением pH. В растворе сулемы (1:100000) они погибают через 5 минут. Под влиянием хлорамина и других дезинфектантов погибают через 5-15 минут. Возбудитель высокочувствителен к хлору: доза активного хлора 0,3-0,4 мг/л за 30 минут вызывает надежное обеззараживание предметов.

Эпидемиология

Холера является типичной антропонозной инфекцией. **Природный**

резервуар - загрязненная вода; **источник инфекции** – больной человек с первых дней заболевания и бактерионоситель. Опасность представляют как больные с типичной формой холеры, так и больные со стертыми, субклиническими и атипичными формами заболевания, а также реконвалесценты после типичной или субклинической формы холеры (вибриовыделители – реконвалесценты). При холере имеет место так называемый феномен “айсберга”, когда на 1 больного приходится до 100 носителей. Продолжительность вибрионоительства у реконвалесцентов редко превышает 2-4 недели, иногда длится до 3 лет. Известно транзитное здоровое носительство, когда заболевание не развивается, но в фекалиях в течение длительного времени обнаруживается возбудитель (характерно для инфекции, обусловленной биоваром Эль-Тор). В литературе описан случай носительства холерного вибриона в течение 13 лет (“холерная” Долорес). **Основные механизмы** передачи - фекально-оральный и контактный. **Факторы передачи** – вода, пищевые продукты, объекты окружающей среды. В воде открытых водоемов холерный вибрион часто находится в ассоциациях с зоопланктоном (в частности, с веслоногими рачками) и водными растениями. **Пути заражения холерой** – водный (через воду, используемую для питья, купания и хозяйственно-бытовых нужд), алиментарный (пищевой) и контактно-бытовой. Определённую роль могут играть мухи, способные переносить возбудителя с испражнений больного человека на пищевые продукты. Пути и факторы заражения человека холерным вибрионом представлены на рисунке 24.

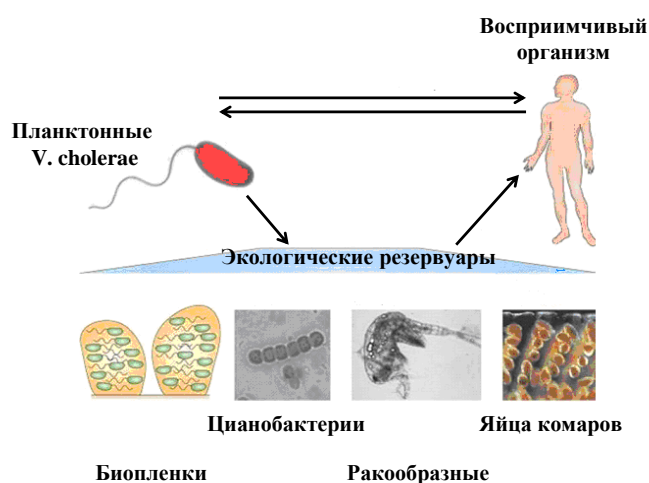


Рисунок 24 – Пути и факторы заражения человека холерой.

Все крупные эпидемии и пандемии холеры были связаны с водой. Больной холерой человек выделяет во внешнюю среду в 1 мл испражнений от 10 млн. до 1 млрд. вибрионов, а бактерионоситель – до 100 тыс. микробных клеток. Переболевшие лица выделяют холерный вибрион в течение 7-10 дней после клинического выздоровления. Примерно у 4-5% переболевших формируется хроническое носительство, при котором холерный вибрион сохраняется в желчном пузыре. Заражающая доза составляет около 1 млн. микробных клеток. Заражение человека от человека не происходит.

Факторы патогенности холерного вибриона

К факторам патогенности холерного вибриона относятся:

- подвижность и хемотаксис (способность бактерий двигаться по направлению к аттрактантам, то есть к питательным веществам);
- факторы адгезии и колонизации: токсин-корегулируемые пили (toxin coregulated pilus, TCP); гемагглютинины; белки внешней мембраны;
- токсины: экзотоксин – холероген (СТ – cholera toxin) и эндотоксин;
- ферменты агрессии: фибринолизин, гиалуронидаза, нейраминидаза, муциназа, протеаза и др.

Благодаря **подвижности** за счет жгутиков и **хемотаксису** холерный вибрион преодолевает слой слизи на поверхности энтероцитов кишечника и вступает во взаимодействие с эпителиальными клетками. У мутантов холерных вибрионов, утративших подвижность или способность к хемотаксису, вирулентность резко снижается.

Основными компонентами микробной клетки, обеспечивающими адгезию (прикрепление) возбудителя холеры к энтероцитам, являются токсин-корегулируемые пили, гемагглютинины и белки внешней мембраны.

Токсин-корегулируемые пили (TCP) или фимбрии представляют собой тонкие гибкие нитевидные образования на поверхности бактериальной клетки. Они состоят из белковых повторяющихся субъединиц с молекулярной массой 20,5 кД. С помощью TCP холерные вибрионы прикрепляются к энтероцитам. После адгезии вибрионы утрачивают подвижность и интенсивно размножаются, колонизируя микроворсинки тонкого кишечника. TCP кодируются кластером генов, входящих в состав островка патогенности VPI. Непосредственно за синтез TCP отвечают гены *tcpA-F*, причем за биосинтез основной субъединицы пилей отвечает ген *tcpA*.

Вместе с TCP в колонизации энтероцитов принимают участие **белки внешней мембраны** холерного вибриона. Основная роль при этом принадлежит белку OmpU, который защищает микробную клетку от бактерицидного действия содержимого кишечника. Кроме того, белки TCP и OmpU являются важными протективными антигенами возбудителя холеры. Антитела к ним прекращают инфекционный процесс, предотвращая адгезию и колонизацию энтероцитов.

Вслед за адгезией и колонизацией происходит синтез **холерного экзотоксина холерогена** – СТ (cholera toxin) и его секреция в окружающую среду. Холероген является главным фактором патогенности возбудителя холеры. Он секретируется в окружающую среду системой секреции II типа. СТ состоит из компонентов А и В. Компонент А имеет молекулярную массу 27,2 кД и состоит из 2 пептидов – А1 и А2, связанных дисульфидными мостиками. Пептид А2 служит для связи фрагментов А и В. Компонент В имеет молекулярную массу 58 кД и состоит из пяти кольцевидно соединенных субъединиц. Компонент В выполняет функцию связывания вибриона с энтероцитами, а компонент А – каталитическую (токсическую) функцию (рисунок 25).

концентрацией катионов и анионов (Na^+ , HCO_3^- , K^+ , Cl^-). Все это приводит к развитию диареи, обезвоживанию и обессоливанию организма. Кроме того, в результате этого в просвете кишечника создается идеальная щелочная среда для размножения возбудителя.

Эндотоксин *V. cholerae* представляет собой термостабильный липополисахарид (ЛПС). Он отвечает за общую интоксикацию организма и рвоту. Антитела, образующиеся против эндотоксина, обладают выраженным вибриоцидным действием (растворяют вибрионы в присутствии комплемента) и являются важным компонентом постинфекционного и поствакцинального иммунитета.

Ферменты агрессии разрушают вещества, содержащиеся в слизи и облегчают продвижение вибрионов к эпителиальным клеткам. В частности, муциназа разрушает муцин, облегчает проникновение вибрионов к поверхности эпителия и открывает доступ к рецептору – ганглиозиду Gm1. Нейраминидаза (сиалидаза), отщепляя от гликопротеинов эпителия сиаловую кислоту, способствует адгезии вибрионов на поверхности энтероцитов. Кроме того, она увеличивает количество рецепторов для холерогена путем модификации три- и дисиалоганглиозидов в моносиалоганглиозид Gm1, который служит рецептором для экзотоксина-холерогена. Ген *nan*, определяющий синтез нейраминидазы (NanH), входит в состав островка патогенности VPI-2.

Основные факторы патогенности холерного вибриона детерминируются генами, расположенными на **мобильных генетических элементах** (МГЭ). К числу МГЭ относятся умеренный профаг CTXφ, два острова патогенности (VPI-1 и VPI-2), два острова пандемичности (VSP-1 и VSP-2), интегронный остров. Биосинтез холерного токсина определяется генами *ctxAB*, входящими в состав профага CTXφ. Бактериофаг φи вызывает лизогенную конверсию холерного вибриона. При этом холерные вибрионы классического биовара продуцируют холерный токсин 1-го типа, а вибрионы биовара eltor – холерный токсин 2-го типа. У нетоксигенных штаммов элемент CTX отсутствует.

МГЭ присутствуют на двух хромосомах *V. cholerae*: большой и малой (рисунок 27).

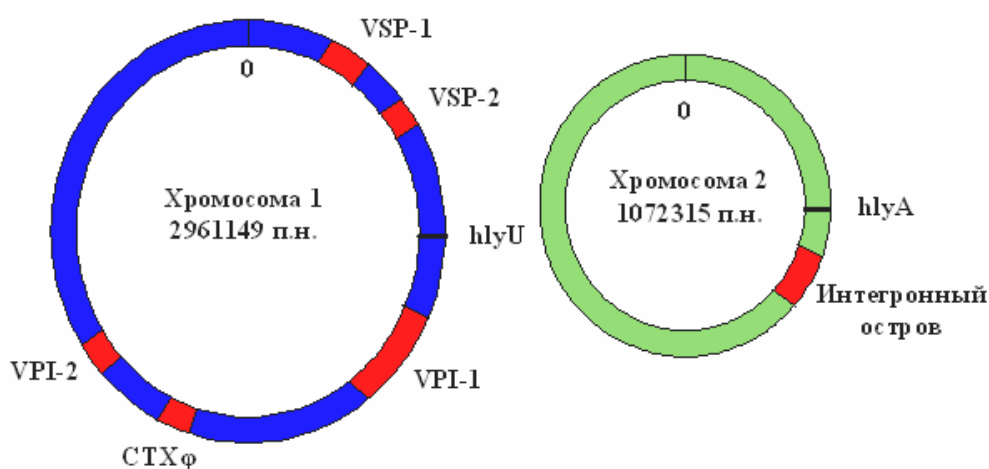


Рисунок 27 – Локализация на хромосомах *V. cholerae* генов, связанных с вирулентностью возбудителя.

Основные гены патогенности холерного вибриона располагаются в составе

МГЭ на большой хромосоме: два острова патогенности (VPI-1 и VPI-2), два острова пандемичности (VSP-1 и VSP-2), элемент СТХф. В состав этих МГЭ входят гены *ctxAB*, кодирующие синтез холерного токсина (СТ); гены *tcpA-F*, кодирующие продукцию токсин-корегулируемых пилей (TCP); ген *zot*, кодирующий токсин Zot (zonula occludens toxin), который действует на плотные межклеточные контакты (zonula occludens); ген *ace*, кодирующий добавочный холерный энтеротоксин Ace (accessory cholera enterotoxin); гены, необходимые для биосинтеза клеточной стенки и О-антигена. В частности, гены *ctxA*, *ctxB*, *zot* и *ace* входят в состав элемента СТХф, представляющего собой геном умеренного бактериофага СТХф (бактериофага фи). В составе генома фага находится также последовательность RS2, кодирующая репликацию фага и его интеграцию в хромосому.

Биосинтез О1-антигена определяется кластером генов *wbe*, а биосинтез О139-антигена – кластером генов, обозначаемых *wbf*.

Образование холерного экзотоксина, токсин-корегулируемых пилей, гемагглютининов и других факторов патогенности регулируют белки, кодируемые генами *toxS*, *toxT* и *toxR*. В зависимости от внешних условий эти белки изменяют экспрессию генов, кодирующих факторы патогенности.

На малой хромосоме локализуются структурные гены *hlyA*, отвечающие за синтез термолабильного гемолизина, а также интегронный остров, содержащий гены антибиотикоустойчивости и участвующий в приобретении новых генов. Ген *hlyA* присутствует в хромосоме всех штаммов холерного вибриона, но в гене *hlyA* холерного вибриона классического биовара имеется делеция, в результате которой гемолитическая активность у этого биовара отсутствует.

Потеря или приобретение новых МГЭ приводит к формированию новых патогенных клонов холерного вибриона. В последнее время выделяются штаммы *V. cholerae eltor*, содержащие классический профаг СТХф и продуцирующие холерный токсин 1-го типа. Такие штаммы отличаются повышенной вирулентностью. В то же время, утрата профага СТХф приводит к снижению вирулентности, но повышает выживаемость вибрионов во внешней среде.

Патогенез холеры

Входными воротами инфекции при холере является пищеварительный тракт. Попад в организм человека, значительная часть вибрионов погибает в желудке под действием соляной кислоты. Оставшаяся часть возбудителя достигает тонкой кишки, щелочная среда которой является благоприятной для размножения холерного вибриона.

Холера является неинвазивной инфекцией, так как вибрионы локализуются на поверхности слизистой оболочки и в просвете тонкого кишечника, не проникая внутрь энтероцитов. Но энтероциты тонкой кишки являются мишенью для холерного экзотоксина. Для достижения клеток-мишеней холерному вибриону необходимо преодолеть слой слизи на поверхности энтероцитов. Преодолению этого барьера способствует подвижность возбудителя, его способность к хемотаксису, образование гемагглютенина-протеазы и муциназы. Гемагглютинин-

протеаза вызывает агглютинацию эритроцитов, расщепляет фибронектин и субъединицу А холерного токсина, отщепляет вибрионы от поверхности энтероцитов, способствуя распространению бактерий по кишечнику и выделению с калом.

Преодолев слой слизи на поверхности тонкой кишки, холерные вибрионы прикрепляются к слизистой оболочке посредством токсин-корегулируемых пилей. После адгезии возбудитель утрачивает подвижность и усиленно размножается, образуя своеобразные колонии в виде бляшек на поверхности энтероцитов и обуславливая колонизацию кишечного эпителия (рисунок 28).

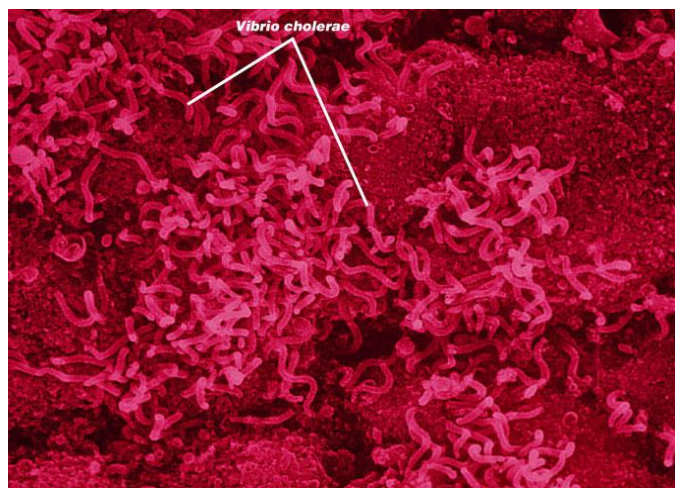


Рисунок 28 – Колонизация холерным вибрионом слизистой тонкого кишечника.

Размножаясь на слизистой оболочке тонкого кишечника, холерный вибрион продуцирует экзотоксин, который с помощью компонента В связывается с рецепторами Gm1, расположенными на наружной мембране энтероцитов. Нейраминидаза, отщепляя от рецептора Gm1 сиаловую кислоту, способствует прочному связыванию компонента В экзотоксина с поверхностью энтероцита. Затем компонент А путем эндоцитоза проникает в цитоплазму клетки и под действием внутриклеточных ферментов высвобождает активный фрагмент А1. Этот фрагмент взаимодействует с белком G, локализованным на внутренней поверхности клеточной мембраны, и устраняет его тормозящего влияния на аденилатциклазу. В результате последовательных реакций в клетке образуется цАМФ. Накопление большого количества цАМФ нарушает в энтероцитах функцию трансмембранного электролитного насоса: открываются каналы для выхода в просвет кишки ионов хлора, натрия, калия, гидрокарбонат-ионов и воды (рисунок 29).

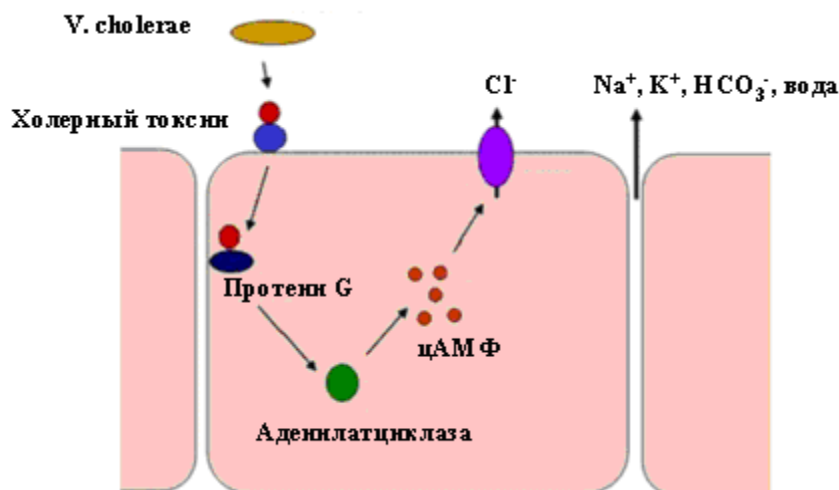


Рисунок 29 – Патогенез холеры.

Нарушение водно-солевого баланса приводит к рвоте и диарее, при которой организм теряет до 2 л воды в час. С 1 л испражнений организм теряет 5 г хлорида натрия, 4 г гидрокарбоната натрия, 1 г хлорида калия. Объем испражнений может достигать 20-30 л в сутки. В результате этого происходит обезвоживание организма. Стул при этом приобретает характерную консистенцию “рисового отвара” из-за присутствия в солевом растворе эпителиальных клеток кишечника. Потеря воды и электролитов приводит к развитию тяжелого обезвоживания, шока в результате гиповолемии, гипокалиемии и метаболического ацидоза, судорог, холерного алгида, пареза кишечника.

Эндотоксин холерного вибриона воздействует на арахидоновую кислоту, входящую в состав фосфолипидов клеточных мембран. В результате этого происходит синтез простагландинов, которые вызывают сокращение гладкой мускулатуры тонкого кишечника и обуславливают тенезмы.

Клиническая картина холеры

Течение холеры может быть типичным или атипичным. Типичное течение заболевания в зависимости от степени обезвоживания организма может протекать в легкой форме (дегидратация составляет до 3% от массы тела), среднетяжелой форме (дегидратация составляет 4-6% от массы тела), тяжелой форме (дегидратация составляет 7-9% от массы тела) и крайне тяжелой форме (дегидратация составляет свыше 9% от массы тела). В 80-90% случаев холера протекает в легкой или среднетяжелой форме. Атипичное течение холеры может протекать в стертой форме, в форме геморрагической или сухой (без диареи) холеры. Менее чем в 20% случаев развивается типичная холера с признаками умеренного или тяжелого обезвоживания.

Инкубационный период при холере варьирует от нескольких часов до 6 суток, чаще всего - 1-2 дня.

В первый период заболевания (легкая степень, холерный энтерит) на

фоне нормальной температуры отмечается редкий жидкий стул и рвота. Самочувствие больного удовлетворительное. Больные жалуются на сухость во рту, жажду, мышечную слабость. Заболевание продолжается 1-2 дня.

Во второй период заболевания (среднетяжелая степень, острый гастроэнтерит) наблюдается частая рвота, урчание в животе, частый стул (15-20 раз в сутки), который постепенно теряет каловый характер и принимает вид “рисового отвара” - мутная жидкость с плавающими в ней клетками эпителия и слизью (рисунок 30).

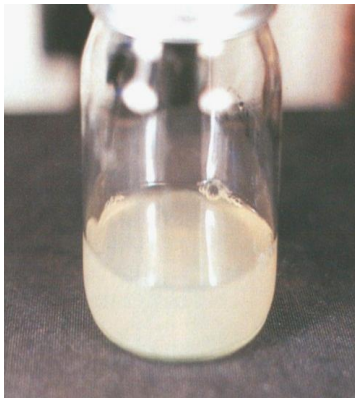


Рисунок 30 – Внешний вид испражнений при холере.

Характерной чертой является сладковатый “рыбный” (не фекальный) запах испражнений (запах сырого тертого картофеля). Появляются судороги отдельных групп мышц. Голос становится сиплым. Тургор кожи уменьшается. Больные жалуются на сухость во рту, жажду, слабость.

В третий период заболевания (тяжелая степень, холерный алгид) у больных отмечается частый обильный водянистый стул, рвота, выраженные судороги мышц, падение артериального давления, одышка, цианоз кожных покровов. В результате обезвоживания черты лица заостряются, глаза западают, голос становится сиплым, иногда наблюдается афония. Характерный признак обезвоживания – “гиппократово лицо” (*facies hippocratica*): запавшие глаза, заострённые черты лица с резко выступающими скулами (рисунки 31 и 32).



Рисунок 31 – Внешний вид больного холерой.



Рисунок 32 – Обезвоживание организма при холере.

Тургор кожи сильно снижен, в результате чего кожная складка не расправляется – симптом “руки прачки” (рисунок 33).



Рисунок 33 – Симптом “руки прачки” при холере.

Температура тела падает ниже нормы. У больных резко снижается объём мочи с развитием острой почечной недостаточности. В результате обезвоживания происходит сгущение крови, развивается цианоз, кислородное голодание, артериальная гипотензия, гипотермия, сердечная недостаточность, анурия, судороги мышц конечностей, живота, лица, нарушение сознания. Это состояние называется **холерным алгидом** (лат. *algidus* – холодный).

Летальность от холеры во время седьмой пандемии варьировала от 1,5% в развитых странах до 50% в развивающихся странах. Выздоровление сопровождается развитием непродолжительного иммунитета.

Микробиологическая диагностика

Диагностические исследования при холере проводятся в специализированных лабораториях, имеющих разрешение на проведение работ с

возбудителем холеры. Основным методом диагностики холеры является бактериологический.

Материалом для исследований служат испражнения, рвотные массы, жёлчь, секционный материал (фрагменты тонкой кишки и жёлчного пузыря), загрязненное испражнениями постельное и нательное бельё, вода, ил, сточные воды, гидробионты, смывы с объектов окружающей среды, пищевые продукты. Для выявления бактерионосительства исследуют испражнения. Испражнения отбирают резиновыми катетерами, стеклянными трубочками с оплавленными краями или ректальными тампонами. Из объектов внешней среды чаще всего исследуют воду открытых водоемов и сточные воды.

При отборе и транспортировке материала необходимо соблюдать следующие правила:

- материал следует доставлять в лабораторию не позднее 2 часов после забора, так как возбудитель быстро погибает, особенно в испражнениях. При невозможности быстрой доставки материала в лабораторию пробы помещают в транспортные среды (1% пептонная вода с pH 8,2-8,6);

- ёмкости для материала нельзя обеззараживать химическими веществами, так как возбудитель чувствителен даже к следовым количествам дезинфектантов;

- после доставки в лабораторию исследуемый материал в возможно короткие сроки высевают на питательные среды.

Основными критериями лабораторной диагностики холеры являются:

- обнаружение в мазках из испражнений тонких изогнутых грамотрицательных палочек, располагающихся в виде “стайки рыб”;

- активная подвижность вибрионов при исследовании раздавленной капли;

- мгновенная иммобилизация (обездвиживание) вибрионов при добавлении О-холерной сыворотки;

- образование голубоватой нежной пленки на пептонной воде через 5-6 часов и характерных колоний на щелочном МПА через 12 часов после посева исследуемого материала;

- агглютинация вибрионов при использовании противохолерных сывороток;

- лизис вибрионов типовыми холерными бактериофагами.

Исследования материала проводят по схеме:

I этап. Из испражнений и рвотных масс готовят мазки, высушивают на воздухе, фиксируют в смеси Никифорова и окрашивают водным раствором фуксина или по Граму. Подвижность бактерий определяют методом раздавленной капли. Исследуемый материал высевают в первую среду накопления - пептонную воду (ПВ), на щелочной МПА и на элективную среду (СЭДХ или TCBS). Посевы инкубируют при температуре 37°C. По результатам проведенных исследований выдают первое предварительное заключение о наличии в исследуемом материале вибрионов.

II этап. Через 6-8 часов инкубирования посевов в термостате производят пересев с первой среды накопления во вторую среду накопления (пептонную воду). Высеваемость холерного вибриона в этом случае повышается на 10%. С первой среды накопления производят также пересев на плотные питательные среды (щелочной МПА, среду TCBS). Из пленки на поверхности ПВ готовят мазки и препараты раздавленной капли. Пленку на ПВ исследуют в реакции агглютинации с

О-холерной сывороткой. Выдают второе заключение о природе выделенного вибриона. Подозрительные колонии с плотных питательных сред пересевают на среды Ресселя или Клиглера для выделения чистых культур.

III этап. Через 12-16 часов от начала исследования производят пересев со второй среды накопления на щелочной МПА, повторно изучают морфологию, подвижность и агглютинабельность культуры, выросшей на второй среде накопления и на плотных питательных средах. При положительных результатах исследования агглютинабельности колоний выдают третье заключение о результатах исследования.

IV этап. Через 18-24 часа с начала проведения работ подозрительные колонии с плотных питательных сред исследуют в реакции агглютинации с холерными сыворотками (О1, О139, Инаба, Огава) и пересевают на двууглеродные среды (лактозосахарозная, глюкозосахарозная, Клиглера) и щелочной агар для выделения чистой культуры и ее идентификации.

V этап. Через 24-36 часов от начала исследования отбирают подозрительные колонии и проводят идентификацию культур по морфологическим, культуральным, биохимическим свойствам, подвижности, агглютинации с помощью диагностических агглютинирующих сывороток О, ОР, Инаба и Огава, фаголизательности с холерными диагностическими фагами.

VI этап. Через 36-48 часов от начала исследования учитывают результаты идентификации выделенных культур и выдают окончательный ответ о возбудителе.

При подозрении на холеру часто проводят ускоренную диагностику по З.В. Ермольевой. Для этого исследуемый материал (испражнения) высевает в пептонную воду, пептонную воду с О-сывороткой и пептонную воду с крахмалом. При положительном результате в пептонной воде наблюдается характерный рост культуры в виде нежной голубоватой пленки на поверхности среды, в среде с О-сывороткой отмечается агглютинация вибрионов, а среда с крахмалом не изменяет своего цвета при добавления йода в результате разложения крахмала.

В настоящее время для экспрессной диагностики применяют метод флюоресцирующих антител (МФА), полимеразную цепную реакцию (ПЦР), реакцию иммобилизации вибрионов (РИВ), реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА).

МФА позволяет идентифицировать выделенную культуру, а также выявить возбудителя холеры серогруппы О1 при его содержании в исследуемом материале не менее чем 10^5 микробных клеток в 1 мл. МФА используют для исследования нативного материала от больных (испражнения и рвотные массы), материала после подрачивания на питательной среде, для выявления холерных вибрионов в воде и смывах.

ПЦР основана на определении генов холерного токсина (*ctxAB*) и токсин-корегулируемых пилей (*tcpA*). Этот метод используют для исследования испражнений, рвотных масс, воды, смывов, стоков, чистых культур вибрионов.

РИВ основана на утрате подвижности холерных вибрионов под влиянием специфических сывороток. Эта реакция позволяет обнаружить возбудителя в течение нескольких минут при концентрации в исследуемом материале не менее 10^5 микробных клеток в 1 мл. Для постановки РИВ на предметное стекло наносят 2 капли исследуемого материала. Первая капля служит контролем, ее накрывают

покровным стеклом. Вторая капля является опытной. К ней добавляют каплю холерной O1 или O139 сыворотки, перемешивают и также накрывают покровным стеклом. Раздавленные капли просматривают под микроскопом. При наличии в исследуемом материале холерных вибрионов в первой капле наблюдается характерная подвижность, а во второй капле отмечается иммобилизация микробных клеток. РИВ позволяет дать ответ через 15-20 минут.

Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) проводится с использованием антительного эритроцитарного холерного диагностикума. РНГА позволяет дать ответ о наличии специфического антигена уже через 2-3 часа.

Принадлежность холерных вибрионов к O1 или O139 серогруппе определяют в реакции слайд-агглютинации (реакции агглютинации на стекле) или в развернутой реакции агглютинации с холерными агглютинирующими сыворотками O1, Инаба, Огава, и O139. В последние годы в идентификации холерных вибрионов используют новые серологические методы: реакцию коагглютинации (РКОА) и реакцию агглютинации объемную (РАО).

Реакция коагглютинации (РКОА) проводится на стекле с помощью диагностикумов, коагглютинирующих O1 и O139 холерные вибрионы. Эти диагностикумы представляют собой препараты, содержащие белок А стафилококков, сенсibilизированный кроличьими O1 и O139 холерными сыворотками. Холерные антитела, сорбированные на стафилококковом белке, при соединении с холерными антигенами вызывают реакцию коагглютинации.

Реакция агглютинации объемная (РАО) используется для выявления липазной активности холерных вибрионов с целью дифференциации гемолитических (атоксигенных) и негемолитических (токсигенных) штаммов *V. cholerae eltor*, выделенных из окружающей среды. РАО проводится в планшетах с использованием полимерного антилипазного иммуноглобулинового диагностикума. Диагностикум выпускается в комплекте с нормальной кроличьей сывороткой.

Определение антител в крови больных (серологическая диагностика холеры) носит вспомогательный характер. Серологическое обследование позволяет подтвердить диагноз в случае атипичного течения заболевания, а также является важным методом ретроспективной диагностики холеры. Для серологической диагностики используют методы, позволяющие выявлять в сыворотке крови больных, вибрионосителей, реконвалесцентов, вакцинированных лиц специфические антитела (агглютинины, антитоксины и вибриоцидные антитела). Специфические агглютинины к холерным вибрионам серогруппы O1 выявляют путем постановки объемной реакции агглютинации (РА), реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) с антигенным поливалентным O1 холерным диагностикумом, реакции нейтрализации антигена (РНАг) с иммуноглобулиновым холерным диагностикумом. Антитоксины к холерным вибрионам серогрупп O1 и O139 выявляют в реакции пассивной гемагглютинации (РПГА) с использованием энтеротоксического холерного диагностикума. Вибриоцидные антитела обнаруживают с помощью реакции вибриоцидных антител (РВА).

Иммунитет

Постинфекционный иммунитет при холере непродолжительный. Иммунитет носит антитоксический и антимикробный характер, обусловлен антителами, клетками иммунной памяти и фагоцитами. При этом антитоксические антитела сохраняются в организме дольше, чем антимикробные антитела.

У больных холерой специфические антитела выявляются на 5-7 день от начала заболевания. Основная роль в иммунитете против холеры принадлежит антителам, продуцируемым местно (на слизистой оболочке кишечника). Антимикробные иммуноглобулины А слизистых оболочек блокируют лиганды на поверхности микробных клеток и препятствуют прилипанию вибрионов к энтероцитам. В результате этого снижается способность холерных вибрионов к адгезии и колонизации, что приводит к быстрому выведению возбудителя из организма при перистальтике кишечника.

Антитоксические антитела взаимодействуют с В-субъединицей экзотоксина, в результате чего блокируют связывание холерогена с рецептором Gm1 на поверхности энтероцитов.

Лечение холеры

При подозрении на холеру больных госпитализируют в специализированное отделение. Лечение больных холерой должно начинаться с восстановления нормального водно-солевого обмена (симптоматическое лечение). С этой целью рекомендуется использовать солевые растворы, содержащие хлорид натрия, бикарбонат натрия, глюкозу. Жидкости вводят как перорально, так и парентерально, внутривенно. Количество вводимого солевого раствора определяют с помощью специальных формул с учетом относительной плотности плазмы и концентрации калия в ней. Потери жидкости определяют, собирая рвотные массы и испражнения в специальную мерную посуду. Для этого больного помещают на так называемую “холерную” кровать Филиппа, имеющую отверстие на уровне ягодич области больного, а транспортировку больного осуществляют на специальных носилках (рисунок 34).

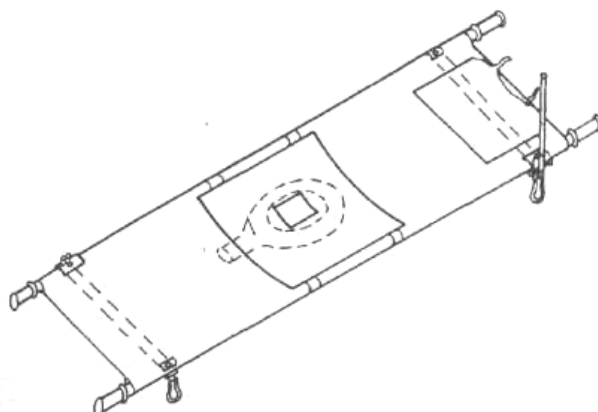


Рисунок 34 – “Холерная” кровать и носилки для транспортировки больного холерой.

Симптоматическое лечение солевыми растворами дополняют антибиотикотерапией, что позволяет снизить летальность при холере до 1% и менее. Из антибиотиков используют препараты тетрациклинового ряда (тетрациклин, доксициклин), фторхинолоны (ципрофлоксацин, ломефлоксацин, офлоксацин), эритромицин, левомицетин (хлорамфеникол).

Профилактика холеры

Профилактика холеры складывается из неспецифических и специфических мероприятий. К мерам **неспецифической профилактики** холеры относятся санитарно-гигиенические мероприятия, предупреждающие занос заболевания; санитарно-просветительная работа среди населения; раннее выявление больных и бактерионосителей; карантинные мероприятия. Особое внимание уделяется снабжению населения качественной питьевой водой, хлорированию воды, соблюдению санитарно-гигиенического режима на пищевых предприятиях, в детских учреждениях, общественных местах. Осуществляется строгий бактериологический контроль воды в открытых водоемах.

Экстренная профилактика холеры проводится путем массового профилактического назначения тетрациклина в районах эпидемической опасности. С этой же целью используют и другие антибиотики, эффективные против *V. cholerae*.

Специфическая профилактика холеры включает вакцинацию населения по эпидемическим показаниям (вакцинация населения в эпидемических районах или вакцинация людей, выезжающих в неблагополучные по холере регионы). Эффективность применения вакцин не превышает 60-70%, невосприимчивость после вакцинации сохраняется в течение 3-8 месяцев.

В настоящее время имеются следующие пероральные противохолерные вакцины:

- **вакцина WC/BS** состоит из инаktivированных клеток *V. cholerae* серогруппы O1 с добавлением очищенной В-субъединицы холерного анатоксина. Вакцина обеспечивает защиту в течение шести месяцев после подкожного введения двух доз с недельным интервалом;

- **модифицированная вакцина WC** (убитая корпускулярная холерная вакцина) состоит только из инаktivированных холерных вибрионов и не содержит В-субъединицы холерного анатоксина. Применяется две дозы с недельным интервалом. Убитые корпускулярные вакцины готовятся на основе вирулентных штаммов холерного вибриона классического биотипа или биотипа Эль-Тор сероваров Инаба и Огава, выращенных при температуре 37⁰С в течение 18-20 часов и инаktivированных нагреванием (54⁰С в течение 1 часа) или формалином. Препараты выпускают в жидком или лиофилизированном виде.

- **вакцина CVD 103-HgR** состоит из ослабленных живых генетически модифицированных штаммов *V. cholerae* серогруппы O1. Штамм CVD 103-HgR получен путем делеции гена субъединицы А холерного токсина и включения в ген гемолизина маркера устойчивости к ртути. Однократная вакцинация

обеспечивает защиту в течение 3-6 месяцев.

При создании живых противохолерных вакцин особое внимание уделяют не только иммуногенности и ареактогенности, но и безопасности препаратов. Под безопасностью подразумевают невозможность повторного приобретения вакцинными штаммами факторов вирулентности спонтанно или в результате горизонтального переноса генов от диких штаммов с помощью бактериофага СТХф *in vivo*.

Препараты для перорального использования предпочтительнее, так как обеспечивают развитие местного иммунитета в слизистой оболочке тонкого кишечника.

В нашей стране разработана холерная вакцина на основе **холерогена-анатоксина**. Препарат представляет собой смесь обезвреженных формалином экзотоксина и О-антигена холерного вибриона серовара Инаба. Холероген-анатоксин получают путем культивирования холерных вибрионов в жидкой питательной среде. В последующем экзотоксин отделяют от бактериальных клеток центрифугированием, очищают сульфатом аммония и обезвреживают формалином. Вакцину выпускают как в жидком, так и в сухом виде. Жидкий препарат анатоксина представляет собой раствор желтовато-коричневого цвета с небольшой опалесценцией. Сухой препарат холерогена-анатоксина представляет собой пористую массу серовато-желтого цвета. Холероген-анатоксин предназначен для создания искусственного активного иммунитета против холеры по эпидемическим показаниям. Применяется однократно.

Вопросы для самоконтроля усвоения материала

1. История изучения холеры и открытия возбудителя заболевания.
2. Таксономическое положение возбудителя холеры.
3. Морфологические и тинкториальные свойства холерного вибриона.
4. Биохимическая активность возбудителя холеры.
5. Культуральные свойства холерного вибриона.
6. Антигенная структура холерного вибриона.
7. Факторы патогенности возбудителя холеры.
8. Эпидемиология холеры.
9. Патогенез холеры.
10. Клиническая картина холеры.
11. Микробиологическая диагностика холеры.
12. Принципы лечения холеры.
13. Профилактика холеры.

Тренировочные тесты

1. Впервые возбудителя холеры обнаружил и описал:

- И.И. Мечников
- Н.Ф. Гамалея
- + Ф. Пачини
- З.В. Ермольева
- Л. Пастер

2. Чистую культуру возбудителя холеры впервые получил:

- Л. Пастер
- + Р. Кох
- Ф. Пачини
- Д. Сноу
- Д.К. Заболотный

3. Холерный вибрион был выделен в чистой культуре:

- Э. Дженнером
- + Р. Кохом
- Л. Пастером
- Л. А. Зильбером
- З. В. Ермольевой

4. Для холерного вибриона характерны следующие свойства:

- + прямая или изогнутая палочка
- положительная окраска по Граму
- + отрицательная окраска по Граму
- способность образовывать споры
- + подвижность

5. Холеру способны вызывать следующие бактерии:

- + *V. cholerae* биовар *cholerae*
- *E. coli*
- + *V. cholerae* биовар *eltor*
- + *V. cholerae* серогруппы O139
- *S. enteritidis*

6. НАГ-вибрионами называют:

- S-формы колоний вибрионов
- R-формы колоний вибрионов
- + холероподобные вибрионы, не агглютинирующиеся O1-сывороткой
- вибрионы, агглютинирующиеся O1-сывороткой
- вибрионы, не агглютинирующиеся сывороткой Огава

7. Для *Vibrio cholerae* характерны признаки:

- овоидная форма
- + форма изогнутой палочки
- перитрихальное расположение жгутиков
- + монотрих
- образование спор

8. *Vibrio cholerae* имеет следующие антигены:

- Vi-антиген
- + соматический О-антиген
- капсульный К-антиген
- + жгутиковый Н-антиген
- перекрестно-реагирующие антигены

9. Возбудитель холеры относится к:

- бациллам
- + вибрионам
- коккам
- спирохетам
- клостридиям

10. Что обозначает название *Vibrio cholerae eltor*?

- название рода
- название вида
- название серовара
- + название биовара
- название семейства

11. Назовите серовары *V. cholerae* O1:

- Бенгал
- + Огава
- + Инаба
- + Гикосима
- Эльтор

12. Холерный вибрион является:

- облигатным анаэробом
- + факультативным анаэробом
- облигатным аэробом
- микроаэрофилом
- капнофилом

13. По разложению каких субстратов вибрионы подразделяются на группы Хейберга?

- глюкоза
- + манноза
- + арабиноза

- + сахароза
- лактоза

14. К какой группе Хейберга относятся холерные вибрионы?

- + первая
- вторая
- третья
- пятая
- шестая

15. Факторами патогенности холерного вибриона являются:

- капсула
- + экзотоксин
- + пили адгезии
- уреазы
- + эндотоксин

16. Место локализации возбудителя холеры в организме:

- желудок
- + поверхность эпителия тонкого кишечника
- пейеровы бляшки
- селезенка
- поверхность эпителия толстого кишечника

17. Назовите источник инфекции при холере:

- птицы
- домашние животные
- + больные люди
- + вибрионосители
- дикие животные

18. Назовите пути передачи холеры:

- воздушно-капельный
- воздушно-пылевой
- + пищевой
- + водный
- + контактно-бытовой

19. Холерой болеют:

- домашние животные
- дикие животные
- + люди
- земноводные
- птицы

20. Основной путь передачи холерного вибриона:

- воздушно-капельный
- + алиментарный
- трансовариальный
- трансплацентарный
- трансмиссивный

21. Входными воротами при холере является:

- носоглотка
- желудок
- + тонкий кишечник
- толстый кишечник
- печень

22. Для бактериологического исследования на холеру от больного забирают:

- кусочки органов
- кровь
- + испражнения
- ликвор
- мочу

23. При исследовании на бактерионосительство холерного вибриона материал из прямой кишки забирают:

- пинцетом
- бактериологической петлей
- + ректальной петлей
- пипеткой
- шпателем Дригальского

24. Холерный вибрион длительно сохраняется:

- в почве
- + в водоемах
- в организме грызунов
- в желудке
- в соляной кислоте

25. Основным методом диагностики холеры является:

- бактериоскопический
- + бактериологический
- серологический
- биологический
- молекулярно-биологический

26. Какой материал используется при бактериологической диагностике холеры?

- + испражнения
- + рвотные массы

- промывные воды желудка
- мочу
- ликвор

27. Для выращивания холерного вибриона используют:

- среду Эндо
- среду Левина
- + щелочной МПА
- + среду TCBS
- висмут-сульфитный агар

28. Элективная среда для выделения холерного вибриона:

- висмут-сульфитный агар
- среда Левина
- кровяной агар
- + щелочной агар
- среда Эндо

29. Характер роста холерного вибриона в 1% пептонной воде:

- диффузное помутнение среды
- + помутнение среды и нежная пленка на поверхности
- осадок в виде “комочка ваты”
- грубая пленка на поверхности среды
- крошковатый осадок, среда прозрачная

30. Колонии холерного вибриона на щелочном агаре:

- имеют вид цветной капусты
- + стекловидно-прозрачные с голубоватым оттенком
- окрашены в черный цвет
- окрашены в красный цвет
- R-формы серо-белого цвета

31. Оптимальное значение pH для роста холерного вибриона:

- 6,0-7,0
- 7,0-7,2
- + 8,2-8,6
- 9,0-10,0
- 10,0-12,0

32. Через какое время обнаруживается рост холерного вибриона в жидкой среде?

- 30-60 минут
- + 6-8 часов
- 12-16 часов
- 18-24 часа
- 24-36 часов

33. Для изучения сахаролитической активности холерного вибриона используют среды:

- Олькеницкого
- + лактозосахарозная
- + глюкозолактозная
- Эндо
- Левина

34. Методом экспресс-диагностики холеры является:

- посев на щелочной агар
- РИФ с выделенной культурой
- + РИФ с испражнениями больного
- биологическая проба
- РА с сывороткой больного

35. Для холеры характерно:

- бактериемия
- + резкое обезвоживание
- геморрагическая сыпь
- + развитие ацидоза
- отеки тканей

36. Испражнения при холере представляют собой:

- обычный кал
- “рисовый” отвар
- кал со слизью
- кал с кровью
- прозрачную жидкость

37. Основой патогенетического лечения холеры является применение:

- холерного бактериофага
- плазмы доноров
- + солевых растворов
- интерферона
- пробиотиков

38. Для дезинфекции при холере используют:

- + кислоты
- щелочи
- + хлорамин
- + перекись водорода
- фенол

39. Средства специфической профилактики холеры:

- О-холерная сыворотка

- + инактивированная вакцина
- + холероген-анатоксин
- холерный диагностикум
- пробиотики

Примечание: знаком “+” отмечены правильные варианты ответов.

Ситуационные задачи

Задача 1. В инфекционную больницу поступил больной, который путешествовал по Индии. Основными симптомами заболевания были рвота и частый водянистый стул, напоминающий “рисовый отвар”. Предварительный диагноз - холера.

Задания:

1. На основании каких данных поставлен предварительный диагноз?
2. Опишите морфологические и тинкториальные свойства возбудителя холеры.
3. Какой материал от больного используется для диагностики?
4. Какие средства используются для лечения больного холерой?

Задача 2. В мазке из испражнений, окрашенном по Граму, выявлены изогнутые палочки в виде запятой розового цвета.

Задания:

1. Какие еще микроскопические исследования можно провести с исследуемым материалом?
2. На какие питательные среды необходимо провести посев исследуемого материала?
3. Какой экспресс-метод диагностики можно провести с исследуемым материалом?

Задача 3. В инфекционной больнице больному поставлен диагноз “Холера”. При микроскопии рвотных масс выявлены грамтрицательные изогнутые палочки.

Задания:

1. В каком препарате можно изучить подвижность выявленных бактерий?
2. Опишите порядок приготовления препарата, окрашенного фуксином Циля.
3. Какие питательные среды используются для посева материала при диагностике холеры?

Задача 4. Из испражнений больного с подозрением на гастроэнтерит выделены подвижные грамтрицательные изогнутые палочки, не образующие спор и капсул. Выделенная культура не ферментирует арабинозу, расщепляет до кислоты маннозу и сахарозу, вызывает гемолиз эритроцитов барана, растет на агаре с полимиксином В.

Задания:

1. Какая бактерия имеет подобные свойства?
2. Назовите признаки, необходимые для подтверждения возбудителя.
3. Какие методы необходимо использовать для подтверждения диагноза?

Задача 5. В мазке из фекалий больного кишечной инфекцией обнаружены изогнутые грамотрицательные палочки.

Задания:

1. Как можно проверить подвижность обнаруженных бактерий?
2. С помощью каких методов можно провести идентификацию возбудителя?

Задача 6. В бактериологическую лабораторию доставлен материал от больного с подозрением на холеру.

Задания:

1. Как необходимо провести исследование и идентификацию возбудителя?
2. Назовите методы ускоренной диагностики холеры.
3. Какие мероприятия необходимо провести в очаге инфекции?

Задача 7. В инфекционную больницу поступил больной с жалобами на неукротимую рвоту и частый жидкий стул в виде “рисового отвара”. В анамнезе имеется контакт с больным холерой при поездке в Индию 2 недели назад.

Задания:

1. Какой материал отбирают от больного для исследования?
2. Порядок проведения лабораторных исследований при холере?
3. Как учитывают результаты проведенных исследований?

Приложение 1

Состав питательных сред, применяемых при культивировании холерного вибриона

1. Основной раствор пептона. Предназначен для накопления холерного вибриона. Состав: пептон – 100 г, натрия хлорид – 50 г, калия нитрат – 10 г, натрия карбонат – 25 г, вода дистиллированная – 1000 мл. рН готовой среды устанавливают на уровне $8,5 \pm 0,1$.

2. Щелочная пептонная вода. Является транспортной средой для холерного вибриона. Состав: пептон – 10 г, вода дистиллированная – 1000 мл, 1%-ный раствор калия теллурита – до конечного разведения 1:100000 – 1:200000. рН 8,2-8,4.

3. Щелочной МПА. Предназначен для выращивания холерного вибриона. Состав: вода мясная – 1000 мл, пептон – 10 г, натрия хлорид – 5 г, агар – 20 г. рН $8,0 \pm 0,2$.

4. TCBS-агар (питательный агар с тиосульфатом натрия, цитратом, бромтимоловым синим и сахарозой). Предназначен для выделения и селективного культивирования возбудителя холеры и других энтеропатогенных вибрионов. Состав: пептон – 10 г, дрожжевой экстракт – 5 г, цитрат натрия – 10 г, тиосульфат

натрия – 10 г, бычья желчь – 8 г, сахароза – 20 г, натрий хлористый – 10 г, цитрат железа – 1 г, тимоловый синий – 0,04 г, бромтимоловый синий – 0,04 г, агар – 14 г, дистиллированная вода – 1000 мл. рН $8,6 \pm 0,2$. Готовая среда прозрачная, синезеленого цвета.

5. Среда СЭДХ. Сухая элективно-дифференциальная среда предназначена для выделения и дифференциации холерного вибриона. Состав: пептон – 6 г, натрия карбонат – 1 г, натрий хлористый – 8 г, моющее средство “Прогресс” – 6 г, калия теллурид – 0,03 г, сахароза – 20 г, бромтимоловый синий – 0,04 г, агар – 10 г, дистиллированная вода – 1000 мл. рН $8,0 \pm 0,2$. Готовая среда имеет темно-синий цвет.

6. Среда СЭДХ-М (модернизированная среда СЭДХ). Состав: сухой питательный бульон – 10 г, агар – 10 г, сахароза – 20 г, натрия хлорид – 8 г, натрия карбонат – 0,8 г, натрия цитрат – 10 г, натрия сульфит – 0,3 г, бромтимоловый синий 0,8 г, мезоинозит – 0,8 г, железо-натриевая соль ЭДТА – 0,5 г, уголь активированный 1,2 г, L-цистеин – 0,3 г, калия теллурид – 0,002 г, нитрат висмута – 0,08 г, дистиллированная вода – 1000 мл. рН 8,0. готовая среда имеет темно-фиолетовый цвет.

7. Среда Монсура (таурохолат-теллуридовый агар с желатином). Рекомендована ВОЗ для выделения возбудителя холеры и других вибрионов из клинического материала. Состав: гидролизат казеина – 10 г, натрия хлорид – 10 г, натрия таурохолат – 5 г, натрия карбонат – 1 г, желатин – 30 г, агар – 15 г, 1%-ный раствор теллурида калия 50 мл, вода дистиллированная – 1000 мл. рН $8,5 \pm 0,2$. Готовая среда имеет желтый цвет.

8. Питательный желатин. Предназначен для определения протеолитической активности бактерий. Состав: бульон Хоттингера – 1000 мл, желатин пищевой – 100 г. рН $7,1 \pm 0,1$.

9. Среда Хью-Лейфсона. Предназначена для выявления способности холерного вибриона ферментировать глюкозу как в аэробных, так и анаэробных условиях. Состав: пептон – 2 г, натрия хлорид – 5 г, калия гидрофосфат – 0,3 г, глюкоза – 10 г, бромтимоловый синий – 0,05 г, агар – 2 г, вода дистиллированная – 1000 мл. рН $6,8 \pm 0,2$. Готовая среда имеет зеленовато-синий цвет.

10. Среда Кларка. Предназначена для выявления способности образовывать ацетилметилкарбинол (реакция Фогеса-Проскауэра). Состав: пептон – 0,5 г, калия гидроортофосфат – 0,5 г, глюкоза – 0,5 г, вода дистиллированная – 100 мл.

11. Пептонная вода. Предназначена для изучения свойств возбудителя. Состав: пептон – 10 г, натрия хлорид – 5 г, вода дистиллированная – 1000 мл.

12. Мясо-пептонный бульон. Предназначен для изучения свойств возбудителя. Состав: пептон – 10 г, натрия хлорид – 5 г, вода мясная – 1000 мл. рН $7,2 \pm 0,2$.

13. Среда Клиглера. Предназначена для дифференциации энтеробактерий по способности ферментировать глюкозу, лактозу, образовывать сероводород. Состав: мясной бульон – 1000 мл, пептон – 20 г, лактоза – 10 г, глюкоза – 1 г, натрия хлорид – 5 г, натрия сульфит – 0,4 г, натрия тиосульфат – 0,08 г, железа сульфат – 0,5 г, агар – 20 г, спиртовой раствор фенолового красного – 12 мл. Готовая среда имеет оранжево-красный цвет. Расщепление сахаров сопровождается образованием кислот, что приводит к изменению цвета среды на желтый. Образование

сероводорода сопровождается почернением столбика среды.

14. Лактозосахарозная среда. Предназначена для определения способности разлагать лактозу и сахарозу. Состав: пептон – 5 г, натрия хлорид – 5 г, лактоза – 10 г, сахароза – 1 г, агар – 10 г, индикатор Андрее – 40 мл, вода дистиллированная – 1000 мл. Готовая среда имеет соломенно-желтый цвет. Среду скашивают в пробирках таким образом, чтобы образовывался столбик и скошенная часть. Холерный вибрион ферментируют сахарозу и не разлагают лактозу, поэтому при культивировании в течение 18-24 часов при температуре 37⁰С столбик среды окрашивается в розовый цвет, а скошенная часть не изменяет своей окраски (остается желтого цвета).

15. Глюкозолактозная среда. Предназначена для определения способности разлагать глюкозу и лактозы. Состав: пептон – 5 г, натрия хлорид – 5 г, глюкоза – 1 г, лактоза – 10 г, агар – 10 г, индикатор Андрее – 40 мл, вода дистиллированная – 1000 мл. Готовая среда имеет соломенно-желтый цвет. Среду скашивают в пробирках таким образом, чтобы образовывался столбик и скошенная часть. Холерный вибрион ферментируют глюкозу и не разлагают лактозу, поэтому при культивировании в течение 18-24 часов при температуре 37⁰С столбик среды окрашивается в розовый цвет, а скошенная часть не изменяет своей окраски (остается желтого цвета).

16. Среда Ресселя. Предназначена для определения способности разлагать глюкозу и лактозу. Состав: гидролизат рыбной муки – 12 г, натрия хлорид – 4 г, глюкоза 1 г, лактоза – 10 г, бромтимоловый синий – 0,03 г, агар – 5 г, вода дистиллированная – 1000 г. Среду скашивают в пробирках, оставляя столбик высотой 1,5-3 см. Готовая среда имеет зеленый цвет. Холерный вибрион ферментируют глюкозу и не разлагают лактозу, поэтому при культивировании в течение 18-24 часов при температуре 37⁰С столбик среды окрашивается в желтый цвет, а скошенная часть приобретает синюю окраску.

Приложение 2

Методы изучения свойств холерного вибриона

1. Окраска жгутиков по Лейфсону. Каплю исследуемой культуры наносят на обезжиренное стекло и, наклонив стекло, дают капле стечь в противоположную сторону. Приготовленный препарат высушивают на воздухе. На сухой препарат наносят смесь равных объемов гипертонического раствора хлорида натрия и танина. Протравливание продолжают в течение 5 минут. Затем смесь сливают, препарат осторожно промывают водой и докрашивают раствором розанилина в течение 2-3 минут. Препарат промывают водой, высушивают на воздухе и микроскопируют с иммерсией.

Возможно окрашивать препарат в течение 8-10 минут красителем, состоящим из равных объемов 1,5% хлорида натрия, 3% таниновой кислоты и смеси парарозанилина ацетата (0,9 г) и парарозанилина гидрохлорида (0,3 г) в 96% спирте (100 мл).

2. Ферментативная активность. Ферментацию углеводов и спиртов определяют в жидких средах Гисса с индикатором Андреде. Среда Гисса содержит пептон (10 г), натрия хлорид (5 г), углевод (5-10 г), индикатор Андреде (10 мл), дистиллированную воду (1000 мл). Состав индикатора Андреде: фуксин – 1 г, 1 N раствор натрия гидроксида – 64 мл, дистиллированная вода – 400 мл. Для выявления газообразования в среды помещают поплавки (маленькие трубочки, запаянные с одного конца). Готовые жидкие среды Гисса с индикатором Андреде имеют соломенно-желтый цвет. В приготовленные среды вносят исследуемую культуру и инкубируют при температуре 37°C в течение 18 часов. Расщепление углеводов и спиртов холерным вибрионом сопровождается образованием кислоты без газа и изменением pH, в результате чего цвет среды становится ярко-розовым.

3. Определение типа расщепления глюкозы (тест Хью-Лейфсона). Для изучения способности холерного вибриона расщеплять глюкозу в аэробных и анаэробных условиях используют среду Хью-Лейфсона. Изучаемую культуру засевают уколом в столбик в две пробирки со средой Хью-Лейфсона. После посева в одну из пробирок вносят 0,5-1 мл стерильного вазелинового масла для создания анаэробных условий. Посевы инкубируют при температуре 37°C в течение 1-4 суток. Ферментацию глюкозы холерным вибрионом как в аэробных, так и анаэробных условиях выявляют по изменению окраски среды в желтый цвет.

4. Реакция Фогеса-Проскауэра. Исследуемую культуру высевает в среду Кларка и инкубируют при температуре 37°C в течение 1-3 суток. К 1 мл выросшей культуры добавляют 0,6 мл 6%-ного спиртового раствора α -нафтола и 0,4 мл 40%-ного раствора едкого калия. Пробирки встряхивают и инкубируют при 37°C в течение 1 часа. При положительной реакции среда окрашивается в розовый или ярко-красный цвет.

5. Образование индола. Холерные вибрионы при выращивании в средах (пептонная вода, МПБ), обогащенных триптофаном (0,01%), расщепляют его с образованием индола, что выявляется с помощью индикаторных бумажек после инкубирования при температуре 37°C в течение 18 часов. Индикаторные бумажки представляют собой полоски фильтровальной бумаги, пропитанные насыщенным раствором щавелевой кислоты. Верхний конец сухой индикаторной бумажки фиксируют пробкой. Нижний конец бумажки не должен соприкасаться со средой. При образовании индола (положительная проба) нижний конец бумажки приобретает интенсивный розовый цвет. При отрицательной реакции бумажка сохраняет кремово-желтый цвет.

6. Образование сероводорода. Холерные вибрионы не продуцируют фермент тиосульфатредуктазу и не способны расщеплять неорганические серосодержащие соединения, присутствующие в среде Клигера. Посев культуры вначале проводят по скошенной части в виде прямой линии, а затем уколом в толщу столбика среды. Посевы инкубируют при температуре 37°C в течение 18-24 часов.

7. Определение гемолитической активности вибрионов по Грейгу. Для исследования используют 18-24-часовую культуру возбудителя, выращенную в МПБ. К 1 мл бульонной культуры добавляют равное количество 1%-ной взвеси отмытых эритроцитов барана в растворе натрия хлорида. Полученную смесь осторожно перемешивают, помещают на 2 часа в термостат при температуре 37°C, а затем на сутки в холодильник. При положительной реакции отмечается лизис

эритроцитов (лаковая кровь). В контрольной пробирке (взвесь эритроцитов в бульоне) гемолиз отсутствует.

8. Реакция агглютинации проводится либо на стекле (слайд-агглютинация), либо в пробирке (развернутая реакция агглютинации). В реакции слайд-агглютинации на обезжиренное стекло наносят каплю диагностической сыворотки, в которую добавляют исследуемую культуру. В качестве контроля используют взвесь культуры в 0,9%-ном растворе натрия хлорида. Положительная реакция проявляется через несколько минут образованием хлопьев агглютината.

9. Метод флюоресцирующих антител (МФА). Используется для ускоренной идентификации возбудителя в нативном материале, в материале после подрашивания и в чистой культуре. Позволяет выявлять возбудители холеры серогрупп О1 и О139. Приготовленные мазки обрабатывают флюоресцирующими диагностическими холерными адсорбированными лошадиными иммуноглобулинами. Положительный результат проявляется через 1,5-2 часа специфическим свечением характерных по морфологии микробов.

10. Реакция иммобилизации вибрионов (РИВ). Позволяет обнаружить возбудителя в течение нескольких минут при концентрации его в исследуемом материале не менее 10^5 микробных клеток в 1 мл. Для осуществления реакции на предметное стекло наносят 2 капли исследуемого материала. К одной капле (опыт) добавляют каплю сыворотки серогруппы О1. Обе капли накрывают покровными стеклами и микроскопируют с фазово-контрастным устройством. При наличии в исследуемом образце холерных вибрионов в первой (контрольной) капле наблюдают характерную подвижность, а во второй капле - иммобилизацию микробных клеток и образование через 1-2 минуты неподвижных микроагглютинатов. Реакция иммобилизации специфична и позволяет дать предварительный ответ через 15-20 минут от начала исследования нативного материала. При отрицательном результате используют холерную сыворотку серогруппы О139.

11. Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА). При постановке РНГА используют диагностикум эритроцитарный холерный иммуноглобулиновый. Постановку реакции проводят в соответствии с Инструкцией по применению диагностикума.

12. Определение антибиотикочувствительности. При определении чувствительности культур холерного вибриона к антибиотикам применяют стандартный диско-диффузионный метод. При этом используют диски, пропитанные фторхинолонами (ципрофлоксацин, офлоксацин, ломефлоксацин), левомецетином, рифампицином, тетрациклином (доксидоксициклином).

13. Определение чувствительности культур к диагностическим холерным фагам. В работе используют диагностические холерные бактериофаги - классический и эльтор. Определение чувствительности культур к фагам проводят как с цельными препаратами, так и с их 10-кратными разведениями. Исследование проводят с использованием щелочного агара. Дно чашки с агаром делят на квадраты по количеству образцов фагов с учетом разведений. В пробирку с 5 мл 0,5-0,7% агара, расплавленного и охлажденного до 45°C , добавляют 0,1-0,2 мл бульонной культуры, быстро перемешивают и выливают на поверхность агара. Через 30 минут в центр каждого квадрата наносят по капле суспензии бактериофагов и их

разведений. После подсыхания каплю чашки переворачивают вверх дном и инкубируют при температуре 37°C в течение 18-20 часов. Положительный результат проявляется в виде одного стерильного пятна или группы негативных колоний на месте нанесения капли бактериофага.

14. Определение чувствительности к полимиксину В. В расплавленный и остуженный до 45°C агар вносят полимиксин В до конечной концентрации 50 ед./мл. Среду тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри. На поверхность агара петлей высевают исследуемую культуру. Посевы инкубируют при температуре 37°C в течение 18 часов. На агаре с полимиксином В холерные вибрионы классического биовара не растут, а для вибрионов биовара эльтор этот признак является положительным.

15. Реакция гемагглютинации. На предметное стекло наносят каплю физиологического раствора и суспендируют в ней петлей агаровую культуру. Затем к суспензии добавляют каплю 2,5%-ной взвеси отмытых куриных эритроцитов. Положительная реакция проявляется склеиванием эритроцитов в течение 1 минуты. В качестве контролей служат взвесь эритроцитов в физиологическом растворе и суспензия культуры в физиологическом растворе.

16. Реакция коаггутинации (РКОА). На предметное стекло наносят две капли взвеси холерных вибрионов в 0,9%-ном растворе хлорида натрия. В одну из них добавляют каплю коаггулинирующего диагностикума (опыт), в другую – каплю 0,9%-ного раствора хлорида натрия (контроль). Через 2-3 минуты производят учет результатов на темном фоне. Положительная реакция проявляется в виде полной агглютинации с просветлением жидкости при отсутствии агглютинации в контроле.

17. Реакция агглютинации объемная (РАО). Реакция проводится в полистироловых планшетах. В 3 лунки вносят по 50 мкл 1%-ного раствора нормальной кроличьей сыворотки. В первую лунку добавляют 50 мкл исследуемой бульонной культуры и переносят 50 мкл во вторую лунку, а из второй – в третью лунку. Из третьей лунки 50 мкл удаляют. Затем во все лунки добавляют по 1 капле (25 мкл) диагностикума, содержимое лунок перемешивают покачиванием планшета в течение 1 минуты и оставляют на 2,5 часа при комнатной температуре. В качестве контролей используют ряды лунок, в которые добавляют культуры гемолитичного (атоксигенного) штамма холерного вибриона, негемолитичного (токсигенного) штамма холерного вибриона или МПБ. Положительный результат проявляется в виде ярко-розового агломерата, выстилающего дно лунки равномерным слоем (зонтик). Положительная реакция указывает на продукцию липазы и свидетельствует о гемолитической активности холерного вибриона. При отрицательном результате образуется компактный осадок в центре лунки (пуговка).

18. Методика выявления агглютининов в крови больного в реакции агглютинации (РА). Исследуемую сыворотку титрую в 1%-ной пептонной воде в пробирках от 1:10 до 1:640. В пробирки с титрованной сывороткой вносят по 1 капле бульонной культуры холерного вибриона. Пробирки помещают на 1 час в термостат при температуре 37°C, а затем на 18-24 часа в холодильник. Положительный результат проявляется агглютинацией культуры. Титр агглютининов выражается разведением сыворотки.

19. Определение вибриоцидных антител в сыворотке крови на основе

чашечного метода (Finkelstein). В 5-10 пробирок разливают по 0,9 мл комплемента, разведенного 1:20 раствором хлорида натрия. В первую пробирку вносят 0,1 мл исследуемой сыворотки и тщательно перемешивают. После этого последовательно переносят по 0,1 мл из одной пробирки в следующую, получая десятикратные разведения. Титрование сыворотки проводят на льду. Затем в пробирки с титрованной сывороткой вносят по 0,1 мл взвесь односуточной агаровой культуры холерного вибриона. Пробирки помещают на 1 час в термостат при температуре 37⁰С. После этого пробирки вновь помещают в лед и из каждой пробирки по 0,1 мл культуры высевают на чашки с щелочным агаром. Шпателем суспензию равномерно распределяют по поверхности агара. Чашки инкубируют в течение 18-24 часов при температуре 37⁰С, после чего подсчитывают количество выросших колоний. Вибриоцидным титром считают максимальное разведение сыворотки, которое вызывает гибель не менее 50% клеток холерного вибриона.

20. Определение вибриоцидных антител в сыворотке крови на основе ферментации углеводов. В 5-10 пробирок разливают по 0,45 мл комплемента, разведенного 1:20 1%-ной пептонной водой с сахарозой и индикатором Андреде. Пробирки помещают на лед. В первую пробирку добавляют 0,05 мл исследуемой сыворотки и тщательно перемешивают. После этого последовательно переносят по 0,05 мл из одной пробирки в следующую, получая десятикратные разведения. Во все пробирки вносят по 0,45 мл суспензии агаровой культуры холерного вибриона. Пробирки помещают в термостат (37⁰С) на 5-6 часов, после чего учитывают результаты. Красный цвет содержимого пробирок связан с ферментацией сахарозы размножившимися вибрионами и свидетельствует об отсутствии вибриоцидных антител в исследуемой сыворотке. За титр вибриоцидных антител принимают то наибольшее разведение сыворотки, при котором цвет содержимого пробирок остается неизменным.

21. Определение вибриоцидных антител с использованием холерного иммуноглобулинового эритроцитарного диагностикума (РПГА). В 10 лунок планшеты разливают по 0,9 мл комплемента, разведенного 1:20 1%-ной пептонной водой. В первую лунку вносят 0,1 мл исследуемой сыворотки и титруют ее переносом по 0,1 мл из лунки в лунку. Из последней лунки 0,1 мл разведения сыворотки выливают. Затем во все лунки добавляют по 0,1 мл взвеси холерных вибрионов. Планшету помещают в термостат при 37⁰С. После этого во все лунки добавляют по одной капле 10%-ного раствора формалина. Через час после добавления формалина во все лунки вносят по 1 капле иммуноглобулинового холерного эритроцитарного диагностикума. Содержимое лунок осторожно перемешивают покачиванием планшеты. Через 2-3 часа выдерживания планшеты при комнатной температуре учитывают результаты реакции. За вибриоцидный титр принимают наибольшее разведение сыворотки с отсутствием гемагглютинации в лунке.

Учебная и методическая литература

1. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии:

Учебное пособие для студентов медицинских вузов / Под ред. А.А. Воробьева, А.С. Быкова – М.: Медицинское информационное агентство, 2003. – 236 с.: ил.

2. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: М: ООО “Медицинское информационное агентство”, 2002. – 736 с.

3. Воробьев А.А. Медицинская и санитарная микробиология: учеб. пособие для студ. высш. мед. учеб. заведений / А.А. Воробьев, Ю.С. Кривошеин, В.П. Ширококов. – 2-е изд., стер. – М.: Издательский центр “Академия”, 2006. – 464 с.

4. Инфекционные болезни и эпидемиология: Учебник / В.И. Покровский, С.Г. Пак, Н.И. Брико, Б.К. Данилкин. – 2-е изд. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 816 с.: илл.

5. Кондрашова З.Н., Сергеев А.Г., Козлов А.П., Голиков В.Ф., Мамаев И.Л. Грамотрицательные бактерии. Медицинский Вестник - Журнал для студентов и врачей. Челябинск, 2002.-№ 7 (108). - 60с.

6. Коротяев А.И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: Учебник для студентов мед. вузов / А.И. Коротяев, С.А. Бабичев. - 5-е изд., испр. и доп. – СПб.: СпецЛит, 2012. – 759 с.: ил.

7. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: Учебник для мед. вузов. – 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: СпецЛит, 2002. – 591 с.: ил.

8. Медицинская микробиология / Под ред. В.И. Покровского. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2002. – 768 с.

9. Медицинская микробиология: учебник. 4-е изд. Поздеев О.К. / Под ред. В.И. Покровского. – 2010. – 768 с.

10. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: учебник для студентов медицинских вузов. Под ред. А.А. Воробьева. Учебники и учеб. пособия для высшей школы. Издательство: Медицинское информационное агентство, 2012. – 702 с.

11. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. В 2-х т. Том 1 : учеб. по дисциплине “Микробиология, вирусология и иммунология” для студентов учреждений высш. проф. образования, обучающихся по специальностям 060101.65 “Лечеб. дело”, 060103.65 “Педиатрия”, 060104.65 “Медико-профилактич. дело” / под ред. В.В. Зверева, М.Н. Бойченко. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 448 с.: ил.

12. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. В 2-х т. Том 2 : учеб. по дисциплине “Микробиология, вирусология и иммунология” для студентов учреждений высш. проф. образования, обучающихся по специальностям 060101.65 “Лечеб. дело”, 060103.65 “Педиатрия”, 060104.65 “Медико-профилактич. дело” / под ред. В.В. Зверева, М.Н. Бойченко. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 480 с.: ил.

13. Методические указания. МУК 4.2.2218-07. Лабораторная диагностика холеры.

14. Методические указания МУК 4.2.2315-08. Серологические методы в диагностике холеры. Дополнение к МУК 4.2.2218-07 Лабораторная диагностика холеры.

15. Методические указания. МУК 4.2.2870-11. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики холеры для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней.

16. Мотавкина Н.С., Артемкин В.Д. Атлас по микробиологии и вирусологии. М.: Медицина, 1976. – 307 с.: ил.

17. Поздеев О.К. Медицинская микробиология / Под ред В.И. Покровского. – 3-е изд., стереотип. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. – 768 с.: ил.
18. Руководство по медицинской микробиологии. Частная медицинская микробиология и этиологическая диагностика инфекций. Книга II / Колл. авторов // Под редакцией Лабинской А.С., Костюковой Н.Н., Ивановой С.М. – М.: Издательство БИНОМ, 2010. – 1152 с.: ил.
19. Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии / Под ред. акад. РАМН О.В. Бухарина. М.: Медицина; УрО РАН, 2002. 342 с.
20. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.1.2521-09. Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации.
21. Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований: Учебное пособие / Под ред. А.С. Лабинской, Л.П. Блинковой, А.С. Ещиной. – М.: ОАО “Издательство “Медицина”, 2005. – 600 с.: ил.
22. Интернет-сайты по микробиологии и иммунологии:
 - <http://www.microbiology.ru>
 - <http://ru.wikipedia.org>
 - <http://www.rusmedserv.com>
 - <http://www.molbiol.ru>
 - www.yandex.ru
 - www.Google.ru
 - www.Rambler.ru

Иллюстрированное учебное пособие

Литусов Николай Васильевич

Возбудитель холеры